

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Barbora Doležalová

Transportéry KT/HAK/KUP - role ve vývoji rostliny a reakci na podmínky prostředí
Transporters KT/HAK/KUP - role in plant development and response to environmental
conditions

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.
Konzultanti: Mgr. Marek Šustr, RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Barbora Doležalová

.....

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala své školitelce RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za vedení mé práce, za veškerý čas, který mi věnovala, za její ochotu, užitečné rady a také za její přátelský přístup. Dále děkuji svému konzultantovi Mgr. Markovi Šustrovi za všechny rady a za to, že mi byl od začátku mé práce neustále nápomocen. Moc děkuji Ing. Yvettě Šefrnové za získané zkušenosti při práci v laboratoři a hlavně za to, že mi kdykoliv se vším ochotně pomohla. Děkuji RNDr. Alešovi Soukupovi, Ph.D. za jeho pomoc při mikroskopování. Děkuji také všem členům naší laboratoře za jejich ochotu a cenné rady. Nakonec bych chtěla poděkovat celé své rodině za jejich podporu a za to, že tu pro mě vždycky jsou.

Abstrakt

Draslík je esenciální prvek, který je nezbytný v mnoha rostlinných procesech. Funguje jako hlavní osmotikum a podílí se na regulaci turgoru během růstu buněk nebo při pohybech průduchů. Je také důležitý pro udržení membránového potenciálu. Na transportu K^+ se v rostlinách podílí transportéry z rodiny KT/HAK/KUP. Některé z nich jsou důležité pro příjem K^+ z prostředí (HAK5, KUP7), jiné pro regulaci turgoru buněk (KUP2, KUP6, KUP8). Mezi méně prozkoumané transportéry rodiny KT/HAK/KUP u *Arabidopsis thaliana* patří KUP5 a KUP9, které jsem zkoumala v rámci této diplomové práce.

V rámci diplomové práce jsem analyzovala růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin. Výsledky ukazují, že *kup5* mutantní rostliny nejsou citlivější k podmínkám nedostatku K^+ oproti rostlinám divokého typu, proto KUP5 pravděpodobně není zapojen do příjmu K^+ z prostředí. *Kup5* mutantní rostliny byly většího vzrůstu oproti rostlinám divokého typu, zároveň měly větší buňky kořene a hypokotylu a také delší meristematickou zónu kořene. Tento růstový fenotyp naznačuje, že se KUP5 podílí na regulaci růstu buněk, pravděpodobně prostřednictvím regulace turgoru. Protein KUP5 byl pomocí konstruktů *pKUP5::KUP5-GFP* lokalizován v ER, správnost této lokalizace bude ale potřebovat další ověření. Exprese genu *KUP5* byla pomocí konstruktů *pKUP5::GUS* detekována převážně v rostoucích částech mladých rostlin (elongační zóna kořene, rostoucí hypokotyl, pokožka děložních a prvních pravých listů), ale také v kořenové čepičce a svěracích buňkách průduchů. Tato pozorování podporují teorii o roli KUP5 v regulaci růstu buněk. KUP5 zřejmě není nijak zásadní pro transport K^+ při pohybech průduchů, ale mohl by hrát roli při vývoji svěracích buněk.

Částečně jsem se věnovala i transportéru KUP9. Podílela jsem se na objasnění teorie o roli KUP9 v translokaci K^+ floémem. Dle výsledků experimentů s *kup9* mutantními rostlinami se předpokládaná role KUP9 v efektivitě floémového toku nejvíce jako pravděpodobná, bude potřebovat další ověření.

V souladu s výsledky mých experimentů lze uzavřít, že se transportér KUP5 pravděpodobně podílí na regulaci růstu buněk. Transportér KUP9 se ve floému pravděpodobně neúčastní translokace K^+ . V obou případech je však potřeba provést další experimenty.

Klíčová slova: KT/HAK/KUP, draslík, vysokoafinitní transportéry, stresové faktory

Abstract

Potassium is an essential element, which is important in many plant processes. It functions as a major osmotic and is involved in the regulation of turgor during cell growth or stomatal movements. It is also important for maintaining membrane potential. In plants, potassium transporters from the KT/HAK/KUP family are involved in the transport of K^+ . Some of them are important in the uptake of K^+ from the environment (HAK5, KUP7), others in regulation of cell turgor (KUP2, KUP6, KUP8). In *Arabidopsis thaliana*, less characterized KT/HAK/KUP transporters include KUP5 and KUP9, which I studied in this diploma thesis.

In this diploma thesis, I analyzed the growth phenotype of *kup5* mutant plants. The results show that *kup5* mutant plants are not more sensitive to K^+ deficiency than wild-type plants, therefore KUP5 is probably not involved in the K^+ uptake from the environment. *Kup5* mutant plants were larger than wild-type plants, had larger root and hypocotyl cells as well as longer root meristematic zone. This growth phenotype suggests that KUP5 is involved in the regulation of cell growth, probably through turgor regulation. Using the *pKUP5::KUP5-GFP* construct, the KUP5 protein was localized in the ER, but this localization needs further verification. Using the *pKUP5::GUS* construct, *KUP5* expression was detected predominantly in the growing parts of young plants (root elongation zone, growing hypocotyl, epidermis of growing cotyledons and first true leaves), but also in the root cap and guard cells. These observations support the theory of the role of KUP5 in the regulation of cell growth. KUP5 does not appear to be essential for K^+ transport during the stomatal movements, but could play a role in the guard cells development.

I also partially focused on the KUP9 transporter. I participated in the clarification of the theory about the role of KUP9 in phloem transport. According to the results of experiments with *kup9* mutant plants, the presumed role of KUP9 in phloem flow efficiency does not appear to be probable, it will need further verification.

Consistent with the results of my experiments, it can be concluded that the KUP5 transporter is likely involved in the regulation of cell growth. The KUP9 transporter is probably not involved in K^+ translocation in the phloem. However, in both cases further experiments are needed.

Key words: KT/HAK/KUP, potassium, high affinity transporters, stress factors

Obsah

| | |
|---|----|
| 1 Úvod..... | 1 |
| 1.1 Cíle práce..... | 2 |
| 2 Literární přehled..... | 3 |
| 2.1 Draslík v rostlině | 3 |
| 2.2 Rostlinné K ⁺ transportéry a kanály | 4 |
| 2.2.1 Shaker-like K ⁺ kanály..... | 4 |
| 2.2.2 TPK kanály | 5 |
| 2.2.3 HKT transportéry..... | 5 |
| 2.2.4 CPA transportéry | 6 |
| 2.2.5 KT/HAK/KUP transportéry..... | 6 |
| 2.3 Role KT/HAK/KUP transportérů v růstu a vývoji <i>A. thaliana</i> | 7 |
| 2.3.1 Transportér HAK5 | 7 |
| 2.3.2 Transportér KUP7..... | 8 |
| 2.3.3 Transportéry KUP2, KUP6, KUP8..... | 8 |
| 2.3.4 Transportér KUP4..... | 9 |
| 2.3.5 Transportér KUP9..... | 11 |
| 2.3.6 Transportér KUP5..... | 11 |
| 2.4 Role KT/HAK/KUP transportérů v reakci na stresové podmínky prostředí..... | 13 |
| 2.4.1 Nedostatek vody | 13 |
| 2.4.2 Zasolení půdy | 16 |
| 2.4.3 Nízká a vysoká ozáření | 17 |
| 3 Metodika | 19 |
| 3.1 Rostlinný materiál | 19 |
| 3.2 Genotypování, křížení a selekce mutantů <i>kup5-2</i> | 20 |
| 3.2.1 Izolace DNA pro genotypování..... | 20 |
| 3.2.2 PCR (polymerázová řetězová reakce) pro genotypování | 21 |
| 3.2.3 Agarózová gelová elektroforéza | 23 |
| 3.2.4 Křížení | 24 |
| 3.3 Transformace rostlin | 24 |
| 3.3.1 Metoda transformace | 25 |
| 3.3.2 Plán transformací a použité vektory | 26 |

| | |
|--|----|
| 3.3.3 Postup práce..... | 30 |
| 3.4 Kultivační experimenty | 39 |
| 3.4.1 Kultivační média..... | 39 |
| 3.4.2 Kultivace rostlin <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.4.3 Kultivace rostlin v substrátu | 41 |
| 3.4.4 Hydroponická kultivace..... | 42 |
| 3.5 Analýza rostlin kultivovaných <i>in vitro</i> | 45 |
| 3.5.1 Analýza růstového fenotypu | 45 |
| 3.5.2 Mikroskopická analýza růstových parametrů..... | 45 |
| 3.5.3 Detekce aktivity GUS | 46 |
| 3.5.4 Lokalizace proteinu KUP5 v buňce..... | 47 |
| 3.6 Statistické vyhodnocení..... | 47 |
| 4 Výsledky | 48 |
| 4.1 Analýza růstového fenotypu mutantu <i>kup5-2</i> | 48 |
| 4.1.1 Růst kořenového systému | 48 |
| 4.1.2 Produkce biomasy..... | 50 |
| 4.2 Detailní analýza růstového fenotypu mutantu <i>kup5-1</i> | 53 |
| 4.2.1 Růst kořenového systému | 53 |
| 4.2.2 Růst hypokotylů..... | 56 |
| 4.3 Příprava linií <i>kup5</i> nesoucích konstrukt <i>pKUP5::KUP5:term</i> <i>a pKUP5::KUP5-GFP</i> | 57 |
| 4.4 Lokalizace proteinu KUP5 v buňce pomocí translační fúze <i>pKUP5::KUP5-GFP</i> | 58 |
| 4.5 Lokalizace exprese genu <i>KUP5</i> v rostlině pomocí transkripční fúze <i>pKUP5::GUS</i> | 60 |
| 4.6 Odolnost mutantů <i>kup5</i> vůči suchu | 64 |
| 4.7 Reakce mutantů <i>kup9</i> na různé podmínky prostředí | 68 |
| 4.7.1 Odolnost mutantů <i>kup9</i> vůči suchu | 68 |
| 4.7.2 Reakce mutantů <i>kup9</i> na různou fotoperiodu a ozáření..... | 71 |
| 5 Diskuze | 78 |
| 5.1 Růstový fenotyp <i>kup5</i> mutantních rostlin | 78 |
| 5.1.1 Možný mechanismus způsobující růstový fenotyp <i>kup5</i> mutantních rostlin | 79 |
| 5.1.2 Lokalizace proteinu KUP5 v buňce | 82 |
| 5.1.3 Lokalizace exprese genu <i>KUP5</i> v rostlině..... | 84 |

| | |
|--|----|
| 5.2 Reakce <i>kup5</i> mutantních rostlin na podmínky sucha | 85 |
| 5.3 Reakce <i>kup9</i> mutantních rostlin na podmínky prostředí | 87 |
| 5.3.1 Reakce <i>kup9</i> mutantních rostlin na podmínky sucha | 87 |
| 5.3.2 Reakce <i>kup9</i> mutantních rostlin na podmínky různé fotoperiody a ozáření | 88 |
| 6 Závěr | 90 |
| 7 Seznam použitých zdrojů | 92 |

Seznam použitých zkratek

ABA – kyselina abscisová (abscisic acid)
AC – adenylátcykláza (adenylate cyclase)
AKT1,2 – draselné kanály (*Arabidopsis* K⁺ transport channel 1,2)
AMT1;3 – transportér amonného iontu (ammonium transporter 1;3)
ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BOR1 – transportér borátového iontu (high boron requiring 1)
BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CHX10,13,15,24 – antiportery kationů/protonů (cation/H⁺ exchanger 10,13,15,24)
CPA – antiportery kationů/protonů (cation-proton antiporters)
CTAB – cetyltrimethylammoniumbromid (cetyltrimethyl ammonium bromide)
DNA – deoxyribonukleotidová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTP – deoxyribonukleotidy (deoxyribonucleotide triphosphate)
DMSO – dimethylsulfoxid (dimethyl sulfoxide)
DW – suchá hmotnost (dry weight)
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ER – endoplazmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
FW – čerstvá hmotnost (fresh weight)
GFP – zelený fluorescenční protein (green fluorescence protein)
GORK – draselný výtokový kanál (guard cell outward rectifying channel K⁺)
GUS – β glukuronidáza (β glucuronidase)
HAK5 – vysokoafinitní transportér K⁺ (high affinity K⁺ 5)
HATS – vysokoafinitní transportní systém (high affinity transport system)
HKT1 – vysokoafinitní transportér K⁺ (high affinity K⁺ transporter 1)
KAT1,2 – draselné kanály (K⁺ channel *Arabidopsis thaliana* 1,2)
KCO1 – draselný kanál (outward rectifying K⁺ channel 1)
KEA1,2,3 – draselné antiportery (K⁺ efflux antiporter 1,2,3)
KIN7 – kináza fosforylující draselný kanál TPK1 (kinase 7)
KT/HAK/KUP – rodina vysokoafinitních draselných transportérů (K⁺ transporter/high-affinity K⁺/K⁺ uptake permease)
KUP1,5,6,7,8,9 – draselné transportéry (K⁺ uptake permease 1,5,6,7,8,9)
kup5,7,9 – mutantní rostliny v draselných transportérech KUP5, KUP7, KUP9
KUP2/SHY3 – draselný transportér (K⁺ uptake permease 2/short hypocotyl 3)
kup268 – trojitý mutant v draselných transportérech KUP2, KUP6, KUP8
KUP4/TRH1 – draselný transportér (K⁺ uptake permease 4/tiny root hair 1)
LATS – nízkoafinitní transportní systém (low affinity transport system)
LB – levý primer komplementární k T-DNA inzerci (left border primer of T-DNA insertion)
LP – levý genomový primer (left genomic primer)
MPM – doména proteinu zahrnující jednu transmembránovou část, smyčkou tvořící pór transportéru a druhou transmembránovou část (transmembrane domain – pore loop – transmembrane domain)

MS – Murashige-Skoog médium
 NHX1,8 – transportéry Na^+/H^+ (Na^+/H^+ exchanger 1,8)
 NHX7/SOS1 – transportér Na^+/H^+ (Na^+/H^+ exchanger 7/salt overly sensitive 1)
 NRT1;1 – transportér nitrátu (nitrate transporter 1;1)
 PAR – fotosynteticky aktivní radiace (photosynthetic active radiation)
 PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
 PIN1 – transportér auxinu (pin-formed 1)
 PVP – polyvinylpyrrolidon (polyvinylpyrrolidone)
 RFP – červený fluorescenční protein (red fluorescence protein)
 RNA – ribonukleotidová kyselina (ribonucleic acid)
 ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
 RP – pravý genomový primer (right genomic primer)
 RWC – relativní obsah vody (relative water content)
 SDS – dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
 SKOR – draselný kanál (stelar K^+ outward rectifier)
 SLAC1 – pomalý aniontový kanál (slow anion channel associated 1)
 SLAH3 – homologní kanál k SLAC1 (SLAC1 homolog 3)
 SOC – médium použité při elektroporaci bakterií (Super Optimal broth with Catabolite repression)
 SOS1 – Na^+/H^+ antiporter transportující nadbytek Na^+ z buněk (salt overly sensitive 1)
 SOS2 – proteinkináza fosforylující antiporter SOS1 (salt overly sensitive 2)
 SOS3 – Ca^{2+} vazebný protein aktivující proteinkinázu SOS2 (salt overly sensitive 3)
 SRK2E/OST1/SnRK2.6 – proteinkináza aktivující SLAC1, inhibující KAT1 (open stomata 1/Snfl-related protein kinase 2.6)
 TPK1,4 – draselné kanály (tandem-pore K^+ channel 1,4)
trk1,2 – kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mutantní v draselných transportérech TRK1, TRK2 (*potassium transporter 1, 2*)
 VK – draselný kanál tonoplastu (vacuolar K^+ -selective)
 wt – rostlina divokého typu (wild type)

1 Úvod

Draslík je pro rostliny jedním z nejdůležitějších prvků, které potřebují pro svůj život. Celkově draslík tvoří 4-6% suché hmotnosti rostlin (Zörb et al., 2014). Rostlinami je přijímán z půdy pomocí kořenů ve formě iontu K^+ . I přes to, že je v půdě obvykle dostatek draslíku, se rostliny často potýkají s jeho nedostatkem. Draslík je vázán v půdních minerálech, proto se ne vždy vyskytuje ve formě K^+ dostupné pro rostliny. V rostlinách působí K^+ jako hlavní osmotikum a reguluje turgor, čímž se podílí na samotném růstu buněk. Přispívá k udržení membránového potenciálu, který je nezbytný pro správné fungování všech buněčných procesů. Umožňuje aktivaci mnoha proteinů a enzymů, které jsou důležité např. při fotosyntéze (Marschner, 2011). Kromě těchto základních funkcí je draslík důležitý pro vyrovnání se s různými podmínkami prostředí, které se mohou neustále měnit. Rostliny se musí vyrovnávat např. s nízkými teplotami, s nedostatkem vody, se zvýšenou salinitou nebo s napadením různými patogeny či herbivory (Cakmak, 2005; Wang et al., 2013). Jednou z prvních reakcí na nedostatek vody, ale i na zvýšenou salinitu, je uzavření průduchů. V tomto procesu hraje draslík velmi důležitou roli, neboť reguluje turgor svěracích buněk a tím otevřenost průduchů (Cotelle and Leonhardt, 2016).

K tomu, aby mohl být draslík efektivně přijímán, transportován po rostlině a mohl plnit esenciální funkce, slouží specifické K^+ kanály a transportéry. Jednou z hlavních skupin transportérů K^+ je rodina KT/HAK/KUP (K^+ transporter/high-affinity K^+/K^+ uptake permease). U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že transportér HAK5 (high affinity K^+ 5) z rodiny KT/HAK/KUP je jedním z nejdůležitějších transportérů zajišťujících příjem K^+ z půdy (Qi et al., 2008). Dále bylo popsáno, že transportér KUP7 (K^+ uptake permease 7) se účastní příjmu, ale i nakládání K^+ do xylému (Han et al., 2016). KUP4/TRH1 (K^+ uptake permease 4/tiny root hair 1) je dokonce schopný kromě K^+ transportovat i auxin a podílet se tak na vývojových procesech kořenů rostlin (Daras et al., 2015; Rigas et al., 2013). Při nefunkčnosti transportérů KUP2, KUP6 a KUP8 (K^+ uptake permease 2,6,8) se za podmínek nedostatku vody kořenový systém chová jako by se v podmínkách nedostatku vody vůbec nenacházel, neodpovídá na signalizaci ABA (kyselina abscisová) a dál vytváří postranní kořeny (Osakabe et al., 2013). Transportér KUP6 je pravděpodobně důležitý i při zavírání průduchů (Maruyama et al., 2009; Osakabe et al., 2013). Je tedy patrné, že transportéry této rodiny jsou významné při vývojových procesech rostlin, ale i při reakcích na různé podmínky prostředí. Ne u všech transportérů

rodiny KT/HAK/KUP byla jejich funkce zcela objasněna. Příkladem jsou transportéry KUP5 (K^+ uptake permease 5) a KUP9 (K^+ uptake permease 9). Těmto transportérům se již v naší laboratoři věnovali nebo dále věnují Mgr. Marek Šustr a Mgr. Hana Štočková. Bližší charakterizaci a objasnění funkce KUP5 a KUP9 se věnuji i já v této diplomové práci.

1.1 Cíle práce

Tato diplomová práce částečně navazuje na mou bakalářskou práci, kde jsem analyzovala reakci rostlin na přítomnost NH_4^+ v prostředí. Okrajově jsem se v ní zabývala právě draslíkem, protože jedním z projevů nadbytku NH_4^+ je deficiencie K^+ v rostlině vznikající v důsledku interference mezi oběma ionty při příjmu z půdy (Hoopen et al., 2010). Více však navazuji na experimenty Mgr. Šustra a Mgr. Štočkové a pokračuji v charakterizaci funkce transportérů KUP5 a KUP9 v *A. thaliana*.

Konkrétní cíle práce:

- analyzovat roli KUP5 v rostlině
 - ověřit růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin a blíže jej charakterizovat (s hlavním zaměřením na růst kořenového systému, velikost buněk kořene a aktivitu apikálního meristému kořene)
 - lokalizovat protein KUP5 v buňce a ověřit tuto lokalizaci
 - lokalizovat expresi genu *KUP5* v rostlině
- testovat roli transportérů KUP5 a KUP9 v reakci rostliny na různé podmínky prostředí a abiotické stresové faktory (nedostatek draslíku, sucho, nízká a vysoká ozářenost)

2 Literární přehled

2.1 Draslík v rostlině

Jak jsem již zmínila v úvodu, draslík hraje nezastupitelnou roli v mnoha rostlinných procesech. Podílí se na udržování membránového potenciálu, je nezbytný v proteosyntéze i aktivaci enzymů, působí jako hlavní buněčné osmotikum, umožňuje objemový růst buněk, zajišťuje pohyby prùdchů nebo pohyby rostlin (např. fototropismy) a také se podílí na udržení plynulosti floémového toku (Marschner, 2011). Je tedy důležité, aby si rostliny zajistily dostatečný příjem tohoto prvku. To však není vždy jednoduché. I přes to, že se v půdě obvykle nachází dostatek draslíku, mohou rostliny trpět jeho nedostatkem. Většina draslíku je totiž v půdě vázána v minerálech a není tak pro rostliny vůbec dostupná (Brady and Weil, 1996). Forma draslíku dostupná pro rostliny, kation K^+ , se v půdě vyskytuje v menším množství a navíc je přirozeně vázána na povrchy půdních koloidů (Brady and Weil, 1996). Z těchto půdních koloidů se může K^+ vyvázat výměnou za H^+ , avšak efektivita tohoto procesu je závislá na momentálních podmínkách půdy i na stavu dané rostliny (Brady and Weil, 1996). Rostliny mohou mít nedostatek K^+ i z důvodu vysoké koncentrace NH_4^+ v půdě (Rubio et al., 2008).

Pro příjem K^+ jsou klíčové transportéry a kanály na membránách kořenových buněk. Mechanismus příjmu je založen na dvou systémech - HATS (high-affinity transport system) a LATS (low-affinity transport system). HATS se uplatňuje při nižší dostupnosti K^+ v okolí rostliny (koncentrace v rozmezí 20-200 μM) a LATS při vyšší dostupnosti K^+ (koncentrace více než 200 μM až do milimolárních koncentrací) (Epstein et al., 1963). K^+ transportéry a kanály se zapojují do těchto dvou systémů různou mírou podle svých transportních vlastností (afinity, rychlosti transportu). U některých z nich byla dokonce objevena schopnost přechodu mezi vysokoafinitním a nízkoafinitním stavem. To například umožní nízkoafinitnímu kanálu přijímat K^+ i za velmi nízké dostupnosti v půdě. Takovým případem je kanál AKT1 (*Arabidopsis* K^+ transport channel 1), který je obecně řazen mezi LATS, ale K^+ je schopen přijímat i při jeho nízké externí koncentraci (zde i při $[K^+]=10\mu M$) (Hirsch, 1998). Tato schopnost je velmi důležitá v momentě, kdy vysokoafinitní transportér HAK5, který je spolu s AKT1 nejdůležitější v příjmu K^+ (Pyo et al., 2010), není schopen zajistit jeho příjem za nízkých koncentrací. Taková situace může nastat v případě vyšší koncentrace NH_4^+ v půdě (Rubio et al., 2008). Příjmu K^+ se u *A. thaliana* účastní také KUP1

(K⁺ uptake permease 1) (Kim et al., 1998) nebo KUP7, který se zároveň podílí na nakládání K⁺ do xylému (Han et al., 2016).

Pokud je v půdě nedostatek K⁺ nebo rostlina není schopná zajistit si dostatečný příjem K⁺, mohou se u ní projevit příznaky deficiencie K⁺. Mezi viditelné příznaky patří chloróza starších listů a jejich následné zasychání nebo rychlejší vadnutí, zároveň se snižuje tolerance k některým abiotickým a biotickým stresovým faktorům (např. nízká teplota nebo napadení patogenem) (Marschner, 2011; Wang et al., 2013). Dále jsou patrné změny architektury kořenového systému. Za podmínek nedostatku K⁺ dochází u *A. thaliana* ke snížení počtu a růstu postranních kořenů prvního řádu a růstu hlavního kořene (Hermans et al., 2006; Kellermeier et al., 2014; Šustr et al., 2019). Příčinou je pravděpodobně snížení turgoru buněk elongační zóny kořene a snížení jejich objemového růstu (Pritchard, 1994). Navíc při nedostatku K⁺ dojde ke zpomalení floémového toku a kořeny tak mají méně sacharidů pro svůj růst (Cakmak et al., 1994). Z hlediska fyziologie dochází k omezení transportu látek, k narušení aktivity některých enzymů nebo ke zhoršené regulaci průduchů, čímž se zpomaluje proces fotosyntézy (Marschner, 2011). Sacharóza, která při fotosyntéze vzniká, se hromadí v listech, protože floémový transport je při nedostatku K⁺ zpomalen (Araya et al., 2006; Cakmak et al., 1994; Deeken et al., 2002). Nadbytek sacharózy ve zdrojových listech může rostlině signalizovat, aby snížila expresi fotosyntetických genů (Dijkwel et al., 1996; Pego et al., 2000). Zároveň dochází ke změně struktury chloroplastů a ke snížení obsahu chlorofylu (Zhao et al., 2001).

2.2 Rostlinné K⁺ transportéry a kanály

Pro příjem i transport K⁺ do ostatních částí rostliny je důležitá existence specifických transportérů a kanálů. Všechny dosud objevené transportní systémy pro K⁺ se u rostlin rozdělují do 5 skupin - Shaker-like K⁺ kanály, TPK (tandem-pore K⁺) kanály, HKT (high affinity K⁺ transport) transportéry, CPA (cation-proton antiporters) transportéry a KT/HAK/KUP (K⁺ transport/high affinity K⁺/K⁺ uptake permease) transportéry (Li et al., 2018; Nieves-Cordones et al., 2016; Véry et al., 2014; Wang and Wu, 2013).

2.2.1 Shaker-like K⁺ kanály

Tyto kanály fungují jako tetramery a jsou regulovány napětím na membráně. Celý tetramer mění po hyperpolarizaci či depolarizaci membrány svou konformaci a stává se tak aktivním

v transportu iontu (Lebaudy et al., 2007). Prvním objeveným K^+ kanálem u *A. thaliana* byl KAT1 (K^+ channel *Arabidopsis thaliana* 1) (Anderson et al., 1992; Schachtman et al., 1992). Spolu s KAT1 sem patří také GORK (guard cell outward rectifying channel K^+), přičemž oba dva se uplatňují při pohybech průduchů (Pilot et al., 2001; Szyroki et al., 2001). Dále sem patří SKOR (stelar K^+ outward rectifier), který zajišťuje naložení K^+ do xylému (Gaymard et al., 1998). Také zde nalezneme kanál AKT1, který je hojně lokalizován v rhizodermis a primární kůře kořene, a je velmi důležitý při příjmu K^+ z půdy (Aleman et al., 2011; Hirsch, 1998).

2.2.2 TPK kanály

Pro funkčnost těchto kanálů jsou potřeba 2 podjednotky, které vytvoří transportní pór kanálu (Lebaudy et al., 2007). První kanál tohoto typu byl u *A. thaliana* objeven v roce 1997, a to TPK1 (tandem-pore K^+ 1), podle starších prací nazýván KCO1 (outward rectifying K^+ channel 1) (Czempinski, 1997). TPK1 se nachází na tonoplastu a uplatňuje se při zavírání průduchů, kdy je po fosforylaci kinázou KIN7 (Isner et al., 2018) aktivován a zajistí tak výtok K^+ z vakuoly do cytoplazmy (Gobert et al., 2007). Dalším popsáným kanálem je TPK4 (tandem-pore K^+ 4), který se nachází na plazmatické membráně pylových zrn, kde kontroluje membránový potenciál (Becker et al., 2004).

2.2.3 HKT transportéry

HKT transportéry jsou složeny ze čtyř MPM (transmembrane domain – pore loop – transmembrane domain) částí, které svým uspořádáním vytváří hydrofobní oblast, kudy prochází transportovaný iont (Cao et al., 2011; Hamamoto et al., 2015). Tyto transportéry se v rostlinách účastní transportu K^+ , ale i Na^+ (Corratgé-Faillie et al., 2010). Jak ukazují některé studie, transport K^+ je možný pouze za přítomnosti specifického glycinového zbytku, který je součástí struktury transportéru (Hauser and Horie, 2010; Vieira-Pires et al., 2013). Zatímco u rýže (*Oryza sativa*) bylo v závislosti na kultivaru objeveno 8-9 genů pro tyto transportéry (Garcia-deblás et al., 2003), u *A. thaliana* byl objeven pouze jeden transportér, a to HKT1 (high affinity K^+ transport 1) (Uozumi et al., 2000). HKT1 slouží jako Na^+ transportér a významně se podílí na toleranci *A. thaliana* vůči salinitě (Berthomieu, 2003; Davenport et al., 2007).

2.2.4 CPA transportéry

Tyto transportéry umožňují transport kationu výměnou za H^+ , tzv. antiport. Patří sem NHX (Na^+/H^+ exchanger), KEA (K^+ efflux antiporter) a CHX (cation/ H^+ exchanger) (Mäser et al., 2001; Ye et al., 2013).

Některé NHX jsou u *A. thaliana* důležité při detoxifikaci Na^+ v podmínkách zvýšené salinity, např. NHX1 (Na^+/H^+ exchanger 1) na tonoplastu (Gaxiola et al., 1999) a NHX7/SOS1 (Na^+/H^+ exchanger 7/salt overly sensitive 1) na plazmatické membráně (Shi et al., 2000). NHX8 (Na^+/H^+ exchanger 8) funguje na plazmatické membráně jako Li^+/H^+ transportér (An et al., 2007).

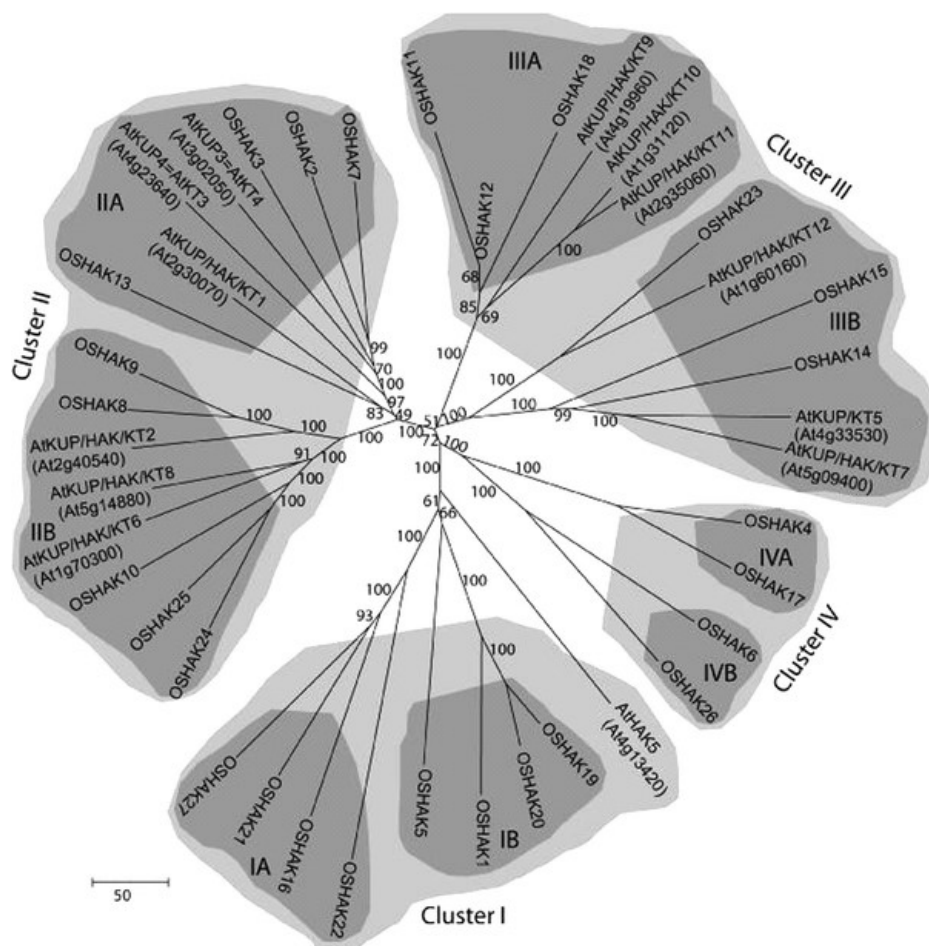
V rodině KEA najdeme transportéry důležité pro udržení integrity chloroplastů a jejich optimálního pH. Řadí se mezi ně KEA1 a KEA2 (K^+ efflux antiporter 1,2), které se nacházejí na vnitřní membráně chloroplastu a ze stromatu výměnou za H^+ transportují K^+ (Kunz et al., 2014). Právě transportem K^+ a H^+ regulují stromatální pH, např. při přechodu rostliny ze světla do tmy (Aranda Sicilia et al., 2020). Dále sem patří KEA3 (K^+ efflux antiporter 3), který se nachází na tylakoidní membráně a transportem K^+ a H^+ udržuje optimální pH lumenu tylakoidů (Kunz et al., 2014; Wang et al., 2017).

V *A. thaliana* najdeme celkem 28 genů pro transportéry typu CHX (Sze et al., 2004). Celkem 11 genů pro CHX je silně exprimováno v pylu, např. CHX10, CHX15 nebo CHX24 (cation/ H^+ exchanger 10,15,24), kde se transportem K^+ podílí na osmoregulaci a hospodaření s vodou (Sze et al., 2004). CHX13 (cation/ H^+ exchanger 13) se uplatňuje při příjmu K^+ za jeho nízké dostupnosti v prostředí (Zhao et al., 2008).

2.2.5 KT/HAK/KUP transportéry

KT/HAK/KUP transportéry byly u rostlin poprvé objeveny u *A. thaliana* (Fu and Luan, 1998; Quintero and Blatt, 1997) a ječmene (*Hordeum vulgare*) (Santa-María et al., 1997) na základě homologie k bakteriálním KUP a houbovým HAK transportérům pro K^+ (Schleyer and Bakker, 1993). Dle některých prací se rozdělují do 4 klastrů (Gupta et al., 2008; Ou et al., 2018) (viz obrázek č. 1), dle jiných prací do 5 klastrů (Nieves-Cordones et al., 2016). Pro tyto transportéry můžeme najít 13 genů v *A. thaliana* (Rubio et al., 2000), 27 genů v rýži (*Oryza sativa*) (Gupta et al., 2008) a 56 genů v pšenici (*Triticum aestivum*) (Cheng et al., 2018). KT/HAK/KUP transportéry se skládají z 10-15 transmembránových podjednotek, přičemž N i C konec se nachází v cytoplazmě (Rubio et al., 2000).

Pravděpodobně fungují jako K^+/H^+ symportéry (Grabov, 2007). Detailněji se o jednotlivých zástupcích a jejich funkcích zmíním v dalších kapitolách tohoto literárního úvodu.



Obrázek č. 1: Fylogenetický strom KT/HAK/KUP transportérů *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa* rozdělující je do 4 klastřů (Gupta et al., 2008); At – *Arabidopsis thaliana*, Os – *Oryza sativa*

2.3 Role KT/HAK/KUP transportérů v růstu a vývoji *A. thaliana*

2.3.1 Transportér HAK5

Transportér HAK5 je důležitý pro efektivní příjem K^+ z prostředí. Byl lokalizován v rhizodermis, což úzce souvisí s jeho funkcí (Gierth, 2005). Je to vysokoafinitní transportér, tudíž se účastní příjmu K^+ především v podmínkách jeho nízké dostupnosti (Qi et al., 2008; Rubio et al., 2008). V podmínkách nízké koncentrace K^+ v prostředí se exprese

genu *HAK5* více než dvakrát zvyšuje, což dokazuje jeho význam v příjmu K^+ (Gierth, 2005; Rubio et al., 2014). Existují ale i situace, ve kterých je exprese genu *HAK5* naopak inhibována. Příkladem této situace je zvýšená koncentrace NH_4^+ v půdě, kdy dochází ke snížení exprese genu *HAK5* (Rubio et al., 2008). V tomto případě musí příjem K^+ zajistit jiné transportní systémy, např. K^+ kanál AKT1 (Pyo et al., 2010).

2.3.2 Transportér KUP7

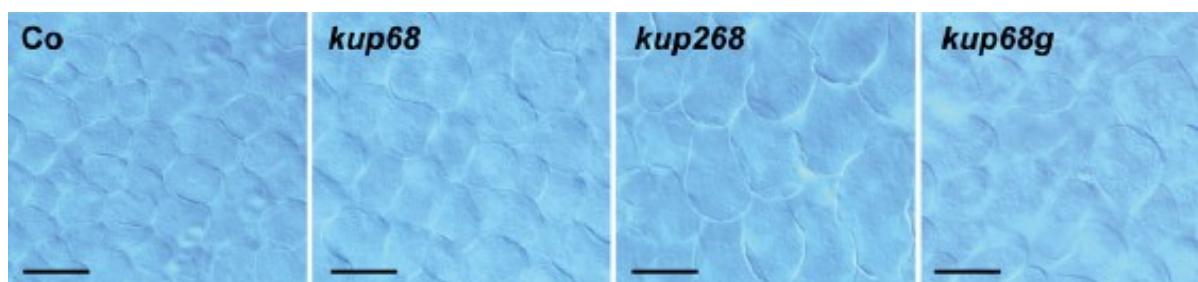
Pro transportér KUP7 byla v mutantech *E. coli* defektních v transportu K^+ dokázána schopnost transportovat K^+ (Ahn et al., 2004). V *A. thaliana* byl KUP7 pomocí GFP lokalizován na plazmatické membráně (Han et al., 2016). Podílí se na příjmu K^+ z prostředí a také zajišťuje translokaci K^+ xylémem, kdy je K^+ transportován z kořenů do prýtu (Han et al., 2016). Kromě K^+ je KUP7 schopen transportovat také Cs^+ . U *kup7* mutantních rostlin bylo v kořenech i v prýtu pozorováno výrazné snížení obsahu Cs^+ (Šustr et al., 2020).

2.3.3 Transportéry KUP2, KUP6, KUP8

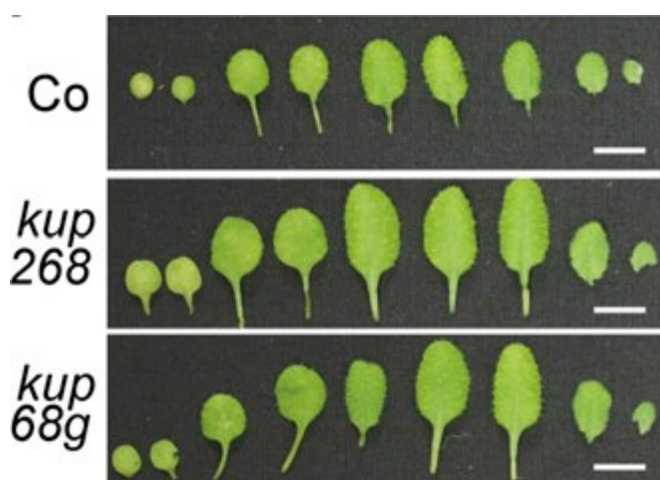
KT/HAK/KUP transportéry jsou kromě příjmu a transportu K^+ důležité také při růstových a vývojových procesech rostlin. Jedním z takových transportérů je KUP2/SHY3 (K^+ uptake permease 2/short hypocotyl 3), který se podílí na regulaci růstu buněk. Gen *KUP2* je v mladých semenáčcích *A. thaliana* exprimován po celé rostlině, kdežto ve čtyřtýdenních rostlinách je výrazná exprese tohoto genu pouze v mladých listech, ve stoncích nesoucích květenství a také v kořenové špičce (Elumalai et al., 2002). Mutantní rostliny *kup2-1/shy3-1* měly kratší hypocotyl a menší listy, což pravděpodobně souviselo se sníženým objemovým růstem buněk a jejich menší velikostí (Elumalai et al., 2002). KUP2 by podle jedné z hypotéz mohl transportovat K^+ do rostoucích buněk. Ovlivnil by tím jejich osmotický potenciál a turgor, a buňky by mohly expandovat a růst (Elumalai et al., 2002). Autoři zmíněné práce však experimentálně nepotvrdili, že by KUP2 opravdu zajišťoval vtok K^+ do buněk (Elumalai et al., 2002).

Transportér KUP2 byl později zkoumán dohromady s transportéry KUP6 a KUP8 a autoři této práce navrhli jiný mechanismus fungování těchto transportérů oproti předchozí práci. Jejich funkce byla zkoumána vytvořením dvojitého mutantu *kup68* a následně trojitých mutantů *kup268* a *kup68gork*. Jak dvojitý mutant, tak trojití mutanti vykazovali větší vzrůst

i velikost buněk oproti rostlinám divokého typu (viz obrázek č. 2) (Osakabe et al., 2013). Vykazovali také vyšší rychlost příjmu radioaktivně značeného ^{86}Rb kořeny. Autoři proto předpokládají, že se KUP2, KUP6 a KUP8 podílejí na výtoku K^+ z buněk. V buňkách mutantních rostlinách *kup268* a *kup68gork* by byl během růstu generován větší turgor v důsledku nadbytku K^+ , což by stimulovalo jejich objemový růst. KUP2, KUP6 a KUP8 by tak prostřednictvím K^+ sloužily jako negativní regulátory růstu. Experimentálně však stejně jako v práci Elumalai et al. (2002) nebylo prokázáno, zda KUP2, KUP6 a KUP8 opravdu transportují K^+ ven z buněk (Osakabe et al., 2013).



Obrázek č. 2: Zvětšené buňky listového mezofylu mutantních rostlin *kup68*, *kup268* a *kup68gork* v porovnání s rostlinou divokého typu vlevo (Osakabe et al., 2013); Co – *A. thaliana*, ekotyp Columbia



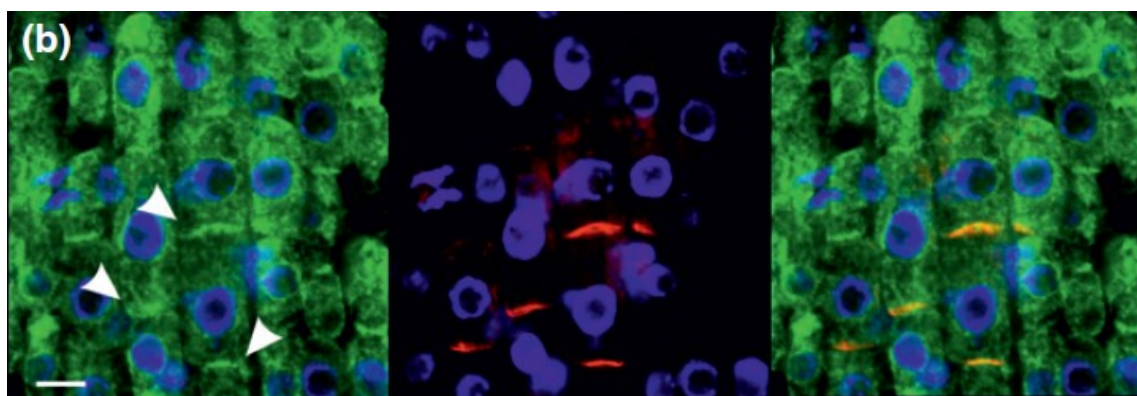
Obrázek č. 3: Velikost listů mutantních rostlin *kup268* a *kup68g* v porovnání s rostlinou divokého typu nahoře (Osakabe et al., 2013); Co – *A. thaliana*, ekotyp Columbia

2.3.4 Transportér KUP4

V transportu K^+ hraje u *A. thaliana* roli také transportér KUP4/TRH1 (K^+ uptake permease 4/tiny root hair 1). Pomocí radioaktivně značeného ^{86}Rb bylo u *kup4/trh1* mutantních rostlin dokázáno snížení transportu K^+ o 40% (Rigas et al., 2001). Zároveň došlo k obnově

transportu K^+ po vnesení *KUP4* do *trk1* (*potassium transporter 1*) mutantních kvasinek rodu *Saccharomyces*, které byly defektní ve vysokoafinitním transportu K^+ (Rigas et al., 2001).

KUP4/TRH1 je ale důležitý i při růstu kořenových vlásků a v gravitropní odpovědi kořene (Rigas et al., 2001, 2013; Vicente-Agullo et al., 2004). Mutantní rostliny *kup4/trh1* vykazovaly defekt ve vývoji kořenových vlásků (Rigas et al., 2001) a primární kořen mutantů *kup4/trh1* abnormální gravitropní odpověď (Vicente-Agullo et al., 2004). Tento fenotyp pravděpodobně souvisel se změnou v transportu auxinu, neboť fenotyp *kup4/trh1* mutanta nebyl potlačen aplikací vysokých dávek K^+ (50 mM) (Rigas et al., 2001), ale aplikací auxinu do růstového média (Vicente-Agullo et al., 2004). Pro detailnější pochopení těchto souvislostí byl v další práci zkoumán společně s KUP4/TRH1 transportér PIN1 (pin-formed 1), který je zodpovědný za výtok auxinu a polarizovanou distribuci auxinu při gravitropismu (Okada et al., 1991; Vieten et al., 2005). Bylo zjištěno, že KUP4/TRH1 je stejně jako PIN1 lokalizován polarizovaně na bazální straně buněk a oba dva transportéry navíc kolokalizují na membráně (viz obrázek č. 4) (Rigas et al., 2013). V mutantech *kup4/trh1* však vykazoval transportér PIN1 lokalizaci na apikální straně buněk, v důsledku čehož došlo k narušení směrovaného transportu auxinu a defektu ve vývoji kořenových vlásků i gravitropní odpovědi kořene. Autoři této práce předpokládají, že transportér KUP4/TRH1 je důležitý pro správnou lokalizaci PIN1 a následnou bazipetální distribuci auxinu (Rigas et al., 2013). KUP4/TRH1 je navíc po dimerizaci schopen přímo transportovat auxin a zřejmě se tak podílí na regulaci distribuce auxinu v kořeni (Daras et al., 2015).



Obrázek č. 4: Lokalizace transportéru KUP4/TRH1 (bílé šipky ukazující na zelený signál na obrázku vlevo), lokalizace transportéru PIN1 (červený signál na obrázku uprostřed), kolokalizace obou transportérů (žlutý signál na obrázku vpravo) (Rigas et al., 2013)

2.3.5 Transportér KUP9

Pro transportér KUP9 byla v mutantech *E. coli* defektních v transportu K^+ dokázána schopnost transportovat K^+ , ale i Cs^+ (Kobayashi et al., 2010). Pro rostliny však tato schopnost dokázána nebyla, u *kup9* mutantních rostlin je zaznamenána vyšší akumulace Cs^+ oproti rostlinám divokého typu za podmínek nízké dostupnosti K^+ (Adams et al., 2019; Genies et al., 2020).

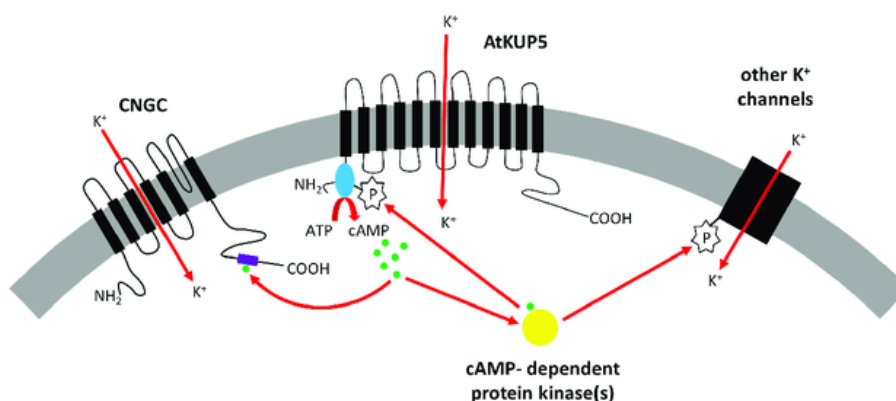
Dle čipových dat je gen *KUP9* exprimován především v kořenech a prašnicích (*Arabidopsis* eFP Browser - <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter et al., 2007).

V nedávné publikaci byla exprese *KUP9* detekována převážně v apikálním meristému kořene a jeho klidovém centru (Zhang et al., 2020). Lokalizace proteinu KUP9 je predikována na plazmatické membráně (Cell eFP Browser - http://bar.utoronto.ca/cell_efp/cgi-bin/cell_efp.cgi; Winter et al., 2007). Autoři zmíněné práce však pomocí translační fúze s GFP lokalizovali protein KUP9 na endoplazmatickém retikulu (Zhang et al., 2020). K charakterizaci transportéru KUP9 v *A. thaliana* použili Zhang et al., 2020 mutantní rostliny *kup9*. Ty vykazovaly za podmínek nedostatku K^+ snížení růstu kořenového systému, což odpovídá i zjištěním naší laboratoře (Šustr, 2015; Šustr et al., 2015). Tento fenotyp pravděpodobně souvisí s účastí KUP9 v distribuci auxinu v rámci apikálního meristému kořene (Zhang et al., 2020). Je ale možné, že má KUP9 význam i mimo apikální meristém kořene, protože exprese *KUP9* byla pomocí transkripční fúze s GUS (β -glukuronidáza) lokalizována také v oblasti vodivých pletiv v celé rostlině (Šustr et al., 2018). Předpokládáme proto, že by KUP9 mohl na dlouhé vzdálenosti ovlivňovat distribuci K^+ či auxinu v rostlině (např. prostřednictvím vlivu na efektivitu floémového toku), což bude testováno v rámci této diplomové práce.

2.3.6 Transportér KUP5

Transportér KUP5 patří mezi transportéry rodiny KT/HAK/KUP, jejichž funkce v *A. thaliana* zatím nebyla zcela objasněna. Schopnost transportovat K^+ byla pro KUP5 dokázána v *trk1-trk2* (*potassium transporter 1, 2*) mutantních kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, které byly defektní v transportu K^+ . Po vnesení genu *KUP5* do těchto kvasinek došlo k obnově transportu K^+ (Al-Younis et al., 2018). Podle autorů této práce je schopnost KUP5 transportovat K^+ pravděpodobně podmíněna přítomností funkční adenylátcyklázy

(AC) na N-terminálním konci proteinu KUP5. V případě bodové mutace v AC totiž nedošlo k obnově transportu v *trk1-trk2* kvasinkách (Al-Younis et al., 2018). V rostlinách však zatím nebyla schopnost transportovat K^+ prokázána. Je možné, že se KUP5 podílí na udržování homeostáze K^+ v buňkách tím, že ovlivňuje ostatní proteiny transportující K^+ . V navrženém modelu se předpokládá, že AC po vazbě ATP generuje cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), který se jako signální molekula váže např. na cAMP-dependentní proteinkinázy, a může tak regulovat aktivitu ostatních K^+ kanálů či transportérů (viz obrázek č. 5) (Al-Younis et al., 2018).



Obrázek č. 5: Možný mechanismus fungování transportéru KUP5 v udržení homeostáze K^+ v buňkách podle Al-Younis et al., 2018; CNGC – iontové kanály (cyclic nucleotide-gated ion channel), cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate), ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate), AtKUP5 – K^+ transportér *A. thaliana* (*A. thaliana* K^+ uptake permease 5)

Dle čipových dat je gen *KUP5* exprimován v celé rostlině (*Arabidopsis* eFP Browser - <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter et al., 2007). Stále však neexistují práce, které by např. pomocí transkripční fúze s GUS analyzovaly expresi *KUP5* v různých částech rostliny. Lokalizace proteinu KUP5 v buňce je predikována na plazmatické membráně (Cell eFP Browser - http://bar.utoronto.ca/cell_efp/cgi-bin/cell_efp.cgi; Winter et al., 2007). V rámci našeho týmu se lokalizací KUP5 zabývala Mgr. Hana Štočková, která pomocí translační fúze s GFP lokalizovala protein KUP5 v endoplazmatickém retikulu (Štočková, 2020). V naší laboratoři byly pro objasnění funkce KUP5 využity *kup5* mutantní rostliny *A. thaliana*. Bylo zjištěno, že mutantní *kup5* vykazují odlišný růstový fenotyp, mají celkově větší vzrůst (delší kořenový systém, větší produkci biomasy) oproti rostlinám divokého typu (Štočková, 2020; Šustr, 2015). Předpokládáme, že by se KUP5 mohl účastnit regulace objemového růstu buněk prostřednictvím regulace turgoru

podobně jako transportéry KUP2, KUP6 a KUP8 (Osakabe et al., 2013). Tato hypotéza bude analyzována v rámci této diplomové práce.

2.4 Role KT/HAK/KUP transportérů v reakci na stresové podmínky prostředí

Jak bylo popsáno výše, transportéry rodiny KT/HAK/KUP hrají roli v příjmu a transportu K^+ v různých částech rostliny. Jsou proto zapojeny i do reakce rostliny na různé stresové faktory prostředí. V následujícím textu zmíním vybrané stresové faktory, pro které byla role transportérů KT/HAK/KUP popsána.

2.4.1 Nedostatek vody

Nedostatek vody je pro rostliny abiotickým stresovým faktorem. Nesouvisí jen s viditelným vadnutím v důsledku poklesu turgoru buněk, ale také s uzavřením průduchů, což je hlavní obranný mechanismus rostlin při nedostatku vody. Kromě zavírání průduchů jsou typickou odpovědí na sucho i změny v architektuře kořenového systému. V obou těchto procesech mají transportéry rodiny KT/HAK/KUP svoji roli.

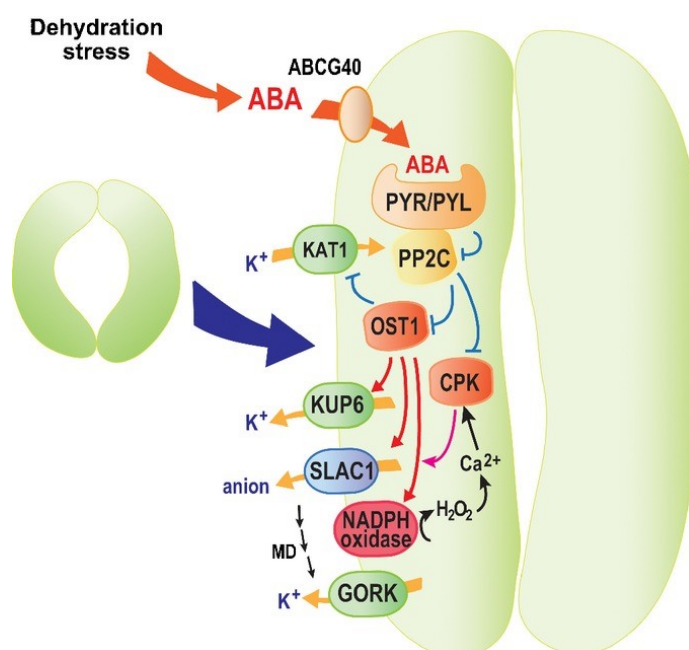
Pohyby průduchů

Mechanismus otevírání a zavírání průduchů je založen na zvyšování a snižování turgoru svěracích buněk, přičemž regulace turgoru se účastní právě K^+ (Cotelle and Leonhardt, 2016). Zásadní roli v tomto procesu hrají K^+ kanály z rodiny Shaker, doplňkovou roli mají transportéry z rodiny KT/HAK/KUP.

Při otevírání průduchů nejprve dochází k aktivaci membránové H^+ ATPázy, která pumpuje H^+ z buňky do apoplastu, čímž dochází k hyperpolarizaci membrány. To je signálem pro otevření vtokových K^+ kanálů z rodiny Shaker, např. AKT1 (Szyroki et al., 2001) nebo KAT1 spolu s KAT2 (Pilot et al., 2001), skrze které proudí do buněk K^+ . Následně se K^+ dostává do vakuoly pomocí specifických K^+/H^+ antiporterů NHX1 a NHX2, kde se hromadí (Andres et al., 2014). Hromadění K^+ zajistí vtok vody do vakuoly, čímž dojde ke zvýšení turgoru ve svěracích buňkách a následnému otevření průduchové štěrbině.

Jako signál k uzavření průduchů slouží např. kyselina abscisová (ABA) (Levchenko et al., 2005). Po jejím působení dojde v buňce k signalizační kaskádě, která vede k aktivaci VK

(vacuolar K^+ -selective) kanálů na tonoplastu, např. TPK1, který zajistí výtok K^+ z vakuoly do cytoplasmy (Gobert et al., 2007). Také se aktivují aniontové kanály, typicky SLAC1 (slow anion channel-associated 1) a SLAH3 (SLAC1 homolog 3) (Geiger et al., 2011), které zajistí výtok Cl^- a NO_3^- z buňky do apoplastu, což způsobí depolarizaci membrány (Levchenko et al., 2005). Na základě této změny membránového potenciálu se otevírá výtokový K^+ kanál GORK, který umožní výtok K^+ z buněk do apoplastu, čímž se sníží turgor a průduchová štěrba se uzavře (Hosy et al., 2003). Schéma uzavírání průduchů je na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6: Schéma zavírání průduchů v odpovědi na nedostatek vody (Osakabe et al., 2014); ABA - kyselina abscisová, PYR/PYL – ABA receptory (pyrabactin resistance 1/PYR1-like), PP2C – regulační proteinfosfatáza (protein phosphatases type 2C), OST1 – proteinkináza aktivující SLAC1, inhibující KAT1 (open stomata 1), KAT1 - vtokový K^+ kanál (K^+ channel *Arabidopsis thaliana* 1), KUP6 – K^+ transportér (K^+ uptake permease 6), CPK – Ca^{2+} dependentní proteinkináza (Ca^{2+} -dependent protein kinase), SLAC1 – pomalý aniontový kanál (slow anion channel-associated 1), GORK – výtokový K^+ kanál (guard cell outward rectifying channel K^+)

Optimální fungování vtokových i výtokových K^+ kanálů ve svěracích buňkách je nezbytné pro plnohodnotné pohyby průduchů a tedy i pro vypořádání se s nedostatkem vody. Mutantní rostliny *gork-1* měly negativně ovlivněno zavírání průduchů v odpovědi na tmu i na ABA, a to z důvodu sníženého výtoku K^+ ze svěracích buněk (Hosy et al., 2003). Přesto však *gork-1* rostliny nevykazovaly odlišný růstový fenotyp oproti rostlinám divokého typu

(Hosy et al., 2003). Důvodem je pravděpodobně existence jiného kanálu/transportéru, kterým rostlina dokáže K^+ transportovat z buněk do apoplastu a průduchy uzavřít. Tuto funkci pravděpodobně zajišťuje transportér KUP6 z rodiny KT/HAK/KUP (viz obrázek č. 6). Exprese genu *KUP6* byla pomocí transkripční fúze *pKUP6:GUS* lokalizována mimo jiné i ve svěracích buňkách (Osakabe et al., 2013). Navíc se exprese genu *KUP6* po působení ABA a po působení stresu z nedostatku vody výrazně zvýšila (Maruyama et al., 2009; Osakabe et al., 2013). Nadměrná exprese *KUP6* po vnesení konstruktů 35S::*KUP6* se v rostlinách projevila rychlejším zavíráním průduchů za normálních podmínek i při nedostatku vody (Osakabe et al., 2013). Podobnou funkci jako KUP6 by mohl mít i transportér KUP8 (Osakabe et al., 2013).

Souvislost existuje i mezi regulací transportéru KUP6 a regulací jiných K^+ transportérů a kanálů, které jsou při pohybech průduchů důležité. Regulace K^+ transportérů a kanálů se ve svěracích buňkách účastní různé molekuly signální dráhy ABA, např. kináza SRK2E/OST1/SnRK2.6 (open stomata 1/Snfl-related protein kinase 2.6) (Yoshida et al., 2006). Touto kinázou je aktivován kanál SLAC1 (Geiger et al., 2009), což následně vede i k aktivaci výtokového K^+ kanálu GORK (Cotelle and Leonhardt, 2016; Hosy et al., 2003). Zároveň je kinázou inhibován vtokový K^+ kanál KAT1 (Sato et al., 2009). Tím se postupně sníží vtok K^+ skrze KAT1, zároveň se zvýší výtok K^+ skrze GORK a průduchy se mohou uzavřít (Cotelle and Leonhardt, 2016). Stejnou kinázou je regulován i transportér KUP6, po jehož aktivaci dojde k výtoku K^+ ze svěracích buněk. Tato souvislost podporuje myšlenku zapojení transportéru KUP6 v pohybech průduchů (Osakabe et al., 2013).

Kromě K^+ se regulace pohybů průduchů může účastnit také sacharóza. K^+ se uplatňuje především v tzv. první (ranní) fázi, kdy se fotosyntéza teprve rozbíhá. Ve druhé (odpolední) fázi, kdy je fotosyntéza maximální, převažuje sacharóza (Talbott and Zeiger, 1996). Jaká osmoregulační látka bude tou převažující, závisí tedy na denní době (rychlosti fotosyntézy) a na podmínkách prostředí (dostupnosti K^+ a sacharózy) (Daloso et al., 2016).

Změny v architektuře kořenového systému

Jednou z odpovědí na nedostatek vody jsou i změny růstu kořenového systému. Je stimulována elongace hlavní osy kořene a inhibováno větvení, což umožňuje efektivněji dosáhnout těch vrstev půdy, ve kterých by se mohla nacházet voda (Dietrich, 2018; Iwata et al., 2013).

Ve spojitosti s nedostatkem vody byly zkoumány transportéry KUP2, KUP6 a KUP8. Při osmotickém stresu obvykle dochází k ABA-indukovanému potlačení růstu postranních kořenů (Fukaki and Tasaka, 2009). U zkoumaných mutantů *kup268* a *kup68gork* k tomuto potlačení růstu nedošlo a na médiu s ABA se postranní kořeny vytvářely (viz obrázek č. 7). KUP2, KUP6 a KUP8 pravděpodobně působí pod kontrolou ABA jako negativní regulátory růstu postranních kořenů. Vzhledem k expresi *KUP6* a *KUP8* v pericyklu, kde se postranní kořeny zakládají, je možné, že při nefunkčnosti zmíněných transportérů se v pericyklu mutantů lokálně hromadí vyšší množství K^+ , které podpoří vznik postranních kořenů bez ohledu na přítomný osmotický stres (Osakabe et al., 2013).



Obrázek č. 7: Mutantní rostliny *kup268*, *kup68g* a *kup68* pod působením ABA tvoří postranní kořeny ve srovnání s rostlinami divokého typu vlevo (Osakabe et al., 2013); Co – *A. thaliana*, ekotyp Columbia

2.4.2 Zasolení půdy

Pokud je v půdě větší množství iontů (především Na^+ a Cl^-), dochází ke snížení vodního potenciálu půdy, v důsledku čehož se redukuje příjem vody (Boursiac et al., 2005). Zasolení tedy vyvolává osmotický stres, ale souvisí také s toxicitou Na^+ . Ve většině případů je toxicita Na^+ spojena s redukcí absorpce K^+ (Hauser and Horie, 2010). Pro toleranci k zasolení je klíčové zajištění příjmu K^+ , udržení K^+ v pletivech a schopnost zbavit se nadbytečného Na^+ (Wu et al., 2018, Hauser and Horie, 2010, Maathuis a Amtmann, 1999). Vzhledem k tomu, že při zasolení dochází k depolarizaci membrány, není příjem K^+ pomocí napěťově řízených kanálů efektivní. Transport K^+ v těchto podmínkách proto zajišťuje rodina KT/HAK/KUP. Kromě již zmíněných transportérů HAK5 a KUP7, které hrají

u *A. thaliana* důležitou roli v příjmu K^+ za podmínek jeho nedostatku (Gierth, 2005; Han et al., 2016), byla zjištěna zvýšená exprese genů *McHAK1*, *McHAK2*, *McHAK3* a *McHAK4* v rostlinách kosmatce (*Mesembryanthemum crystallinum*) vystavených vysoké salinitě (400 mM NaCl) (Su et al., 2002). V podmínkách zvýšené salinity byla také v rostlinách manioku (*Manihot esculenta*) pozorována zvýšená exprese genů *MeKUP2*, *MeKUP3*, *MeKUP4*, *MeKUP6* a *MeKUP8* (Ou et al., 2018).

Co se týče udržení K^+ v pletivech, odrůdy jednotlivých druhů rostlin se podle této schopnosti dělí na tolerantní a senzitivní k salinitě. To platí pro *A. thaliana*, jejíž tolerantní ekotypy zadržují K^+ v kořenech i v listech (Wu et al., 2018), i pro odrůdy ječmene (Chen et al., 2007) nebo vojtěšky (Smethurst et al., 2008).

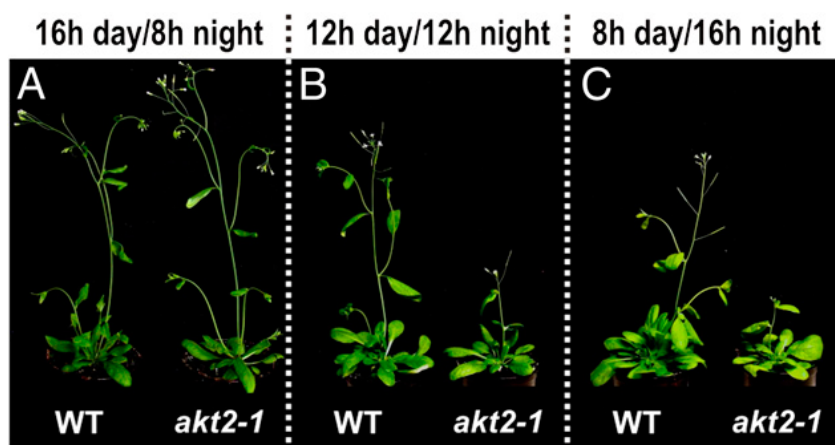
Co se týče detoxifikace Na^+ , na té se zřejmě transportéry KT/HAK/KUP nepodílí, ale zajišťují ji transportéry z jiných rodin. Mezi ně patří antiporter NHX1, jehož overexprese u *A. thaliana* zvýšila toleranci vůči nadměrné salinitě (Apse et al., 1999). NHX1 ukládá Na^+ do vakuoly, čímž vyrovnává poměr Na^+/K^+ (Gaxiola et al., 1999). Dále je u *A. thaliana* známý Na^+/H^+ antiporter SOS1 (salt overly sensitive 1). Tento transportér je součástí celé signalizační dráhy, která umožňuje rostlině reagovat na nadbytek Na^+ . Zvýšená koncentrace Na^+ nastartuje Ca^{2+} signalizaci v cytoplazmě, na kterou reaguje Ca^{2+} vazebný protein SOS3 (salt overly sensitive 3). SOS3 po vazbě Ca^{2+} aktivuje proteinkinázu SOS2 (salt overly sensitive 2), která fosforyluje transportér SOS1 a aktivuje jej. Ten následně transportuje nadbytečný Na^+ ven z buněk (Luan et al., 2009; Zhu, 2000). Pro detoxifikaci Na^+ je důležitý také Na^+/K^+ transportér HKT1. HKT1 se podílí na udržování správného Na^+/K^+ poměru tím, že Na^+ přímo transportuje - nakládá ho do floému (Berthomieu, 2003) a vykládá z xylému (Davenport et al., 2007). V *hkt1* mutantních rostlinách *A. thaliana* se Na^+ akumuloval v listech a způsobil tak jejich chlorózu. Zároveň byl v prýtu a v xylému tohoto mutanta zjištěn nízký obsah K^+ a vysoký obsah Na^+ , čímž se výrazně změnil Na^+/K^+ poměr (Hauser and Horie, 2010; Horie et al., 2006).

2.4.3 Nízká a vysoká ozářenost

Pro rostliny, které nejsou adaptovány na podmínky nízké nebo vysoké ozářenosti, jsou tyto podmínky stresující. V podmínkách nízké ozářenosti je postižena rychlost fotosyntézy, dochází k nižší akumulaci sacharidů v listech a ke zpomalení floémového toku (Pavlová, 2005). V podmínkách vysoké ozářenosti dochází naopak k vyšší akumulaci sacharidů,

vlivem čehož dochází k inhibici fotosyntézy. Zároveň dochází k poškození fotosyntetického aparátu nebo zvýšené produkci ROS (reactive oxygen species) (Suzuki et al., 2012; Pavlová, 2005).

Míra ozáření, ale i délka fotoperiody úzce souvisí s účinností fotosyntézy, od které se odvíjí efektivita transportu vzniklých sacharidů na dlouhou vzdálenost, tedy floémem. Pro fungování floémového toku a nakládání sacharidů do floému je důležitý právě K^+ (Peel and Rogers, 1982). Transportu K^+ ve floému se účastní např. K^+ kanál AKT2, jehož genová exprese je výrazná právě v buňkách floému (Lacombe et al., 2000). AKT2 prostřednictvím transportu K^+ podporuje nakládání sacharidů do floému a jejich transport z listů do ostatních částí rostliny (Gajdanowicz et al., 2011; Deeken et al., 2002). U mutantních rostlin *akt2* byl pozorován odlišný růstový fenotyp, kdy byly *akt2* mutantní rostliny menší oproti rostlinám divokého typu (viz obrázek č. 8) právě v důsledku narušení efektivitu floémového toku (Gajdanowicz et al., 2011). Při změně fotoperiody z dlouhého dne (16 hod světlo, 8 hod tma) na krátký den (8 hod světlo, 16 hod tma) došlo k výraznému prohloubení růstového fenotypu (viz obrázek č. 8). Existuje pravděpodobnost, že i některé transportéry z rodiny KT/HAK/KUP by se mohly účastnit translokace K^+ floémem nebo ovlivňovat efektivitu floémového toku. V rámci této práce je testována možnost, že by tímto transportérem mohl být transportér KUP9. Pro *KUP9* byla mimo jiné pozorována exprese právě v oblasti vodivých pletiv v rámci celé rostliny (Šustr et al., 2018).



Obrázek č. 8: Srovnání růstového fenotypu *akt2* mutantní rostliny a rostliny divokého typu v podmínkách dlouhého dne (A), 12 hod světla a 12 hod tma (B) a krátkého dne (C) (Gajdanowicz et al., 2011)

3 Metodika

3.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty této práce byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. V experimentech bylo použito několik linií T-DNA inzerčních mutantů. Pro charakterizaci transportéru KUP5 (kód genu - At4g33530) byly využity celkem 2 linie. 1. mutantní linii (označena *kup5-1* v celém textu; viz tabulka č. 1) společně s odpovídající rostlinou divokého typu již vyselektovala v rámci své diplomové práce Mgr. Hana Štočková (Štočková, 2020). Tyto rostliny jsem dále používala ve svých experimentech pro bližší charakterizaci růstového fenotypu. Zároveň jsem pracovala s 2. mutantní linií (označena *kup5-2* v celém textu; viz tabulka č. 1), kterou jsem v rámci diplomové práce křížila s rostlinami divokého typu (ekotyp Col-8, N60000, který je genetickým pozadím pro SALK linie) a v F2 generaci jsem získala homozygotní rostlinu divokého typu (wt) a homozygotně mutantní rostlinu (*kup5-2*). Tyto mutantní rostliny *kup5-2* jsem dále používala pro ověření růstového fenotypu, který byl prokázán na mutantech *kup5-1* (Štočková, 2020). Pro charakterizaci transportéru KUP9 (kód genu - At4g19960) byla použita pouze jedna inzerční linie *kup9-1* (viz tabulka č. 1), kterou v rámci své diplomové práce vyselektoval Mgr. Marek Šustr (Šustr, 2015). Semena všech mutantních linií byla objednána z veřejných zdrojů (NASC, Nottingham Arabidopsis Stock Centre; <http://arabidopsis.info>).

| Transportér | Mutantní linie | Kód linie | Místo inzerce |
|-------------|----------------|--------------|---------------|
| KUP5 | <i>kup5-1</i> | SALK_120707C | 5. exon |
| KUP5 | <i>kup5-2</i> | SALK_072850C | 9. exon |
| KUP9 | <i>kup9-1</i> | SALK_108080C | 9. exon |

Tabulka č. 1: Seznam mutantních linií použitých v experimentech této práce; kód linie dle ABRC (*Arabidopsis* Biological Resource Center; <https://abrc.osu.edu>)

3.2 Genotypování, křížení a selekce mutanta *kup5-2*

3.2.1 Izolace DNA pro genotypování

DNA byla z listů *A. thaliana* izolována dle protokolu Edwards et al., 1991. Z rostliny byl ustřižen jeden středně velký lístek, který byl společně s nerezovou kuličkou vložen do 2 ml zkumavky. Nerezová kulička sloužila k rozemletí rostlinného materiálu při jeho homogenizaci. Zkumavky byly zmrazeny v tekutém dusíku, vloženy do kazety vibračního mlýnu (Retsch MM301) a materiál homogenizován (30 s při 30 kmitech/min). Do zkumavek bylo poté přidáno 200 µl extrakčního pufru (viz tabulka č. 2) a po důkladném promíchání byly nerezové kuličky vyjmuty. Směs byla odstředěna pomocí centrifugy (2 min, 14000 ot/min). Supernatant (cca 175 µl) byl přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky a smíchán se stejným objemem izopropanolu. Směs byla promíchána, nechána stát 2 min při laboratorní teplotě a poté opět centrifugována (4 min, 14000 ot/min). Supernatant byl odebrán a peleta obsahující DNA byla rozpuštěna v 1 ml 70 % ethanolu. Směs byla centrifugována (5 min, 14000 ot/min). Ethanol byl slit a peleta byla několik minut vysušena při pokojové teplotě. Po vysušení byla peleta rozpuštěna v 10 µl 10x TE pufru (viz tabulka č. 3) a 90 µl sterilní destilované vody. Zkumavky s genomovou DNA byly skladovány v lednici při 4°C.

| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Použitý objem |
|--------------------|-------------------------------|---------------|
| Tris HCl, pH = 7,5 | 200 mM | 20 ml |
| NaCl | 250 mM | 5 ml |
| EDTA | 25 mM | 5 ml |
| SDS | 0,5 % w/v | 5 ml |
| dH ₂ O | - | 65 ml |

Tabulka č. 2: Složení extrakčního pufru pro izolaci DNA

| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Použitý objem |
|-------------------|-------------------------------|---------------|
| Tris HCl, pH=8 | 1 mM | 1 ml |
| EDTA | 0,5 mM | 0,2 ml |
| dH ₂ O | - | 98,8 ml |

Tabulka č. 3: Složení TE pufru pro izolaci DNA

Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla zjišťována na přístroji NanoDrop (Thermo Scientific). Na místo určené pro nanesení vzorku byl před měřením koncentrace DNA nanesen a změřen tzv. blank, kterým byla destilovaná voda bez obsahu DNA. Poté byl nanesen vždy 1 μl vzorku, který byl spektrofotometricky změřen, a koncentrace DNA byla určena v jednotkách $\text{ng}/\mu\text{l}$.

3.2.2 PCR (polymerázová řetězová reakce) pro genotypování

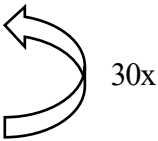
Při PCR dochází k amplifikaci určitého úseku DNA. V tomto případě reakce sloužila k ověření přítomnosti inzerční T-DNA (přítomnosti mutace) v genu *KUP5*. Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v tabulce č. 4. Objem každé reakce byl 20 μl . PCR proběhla v termocykleru (Biometra), jehož nastavení je uvedeno v tabulce č. 5.

Při vysoké teplotě nejprve došlo k denaturaci DNA, kdy se vlákna DNA oddálila od sebe. Dále na každé samostatné vlákno nasedly primery. Genotypovací primery byly navrženy přesně na konkrétní místa DNA tak, aby se při amplifikaci množila její potřebná část. Teplota pro nasedání konkrétních primerů byla určena pomocí *T_m* Calculatoru (www.thermofischer.com). V dalším kroku došlo za účasti DNA polymerázy k syntéze komplementárního vlákna podle vlákna templátového. Tato syntéza běžela při teplotě optimální pro DNA polymerázu. Kroky se 30x opakovaly. Produkty PCR byly dále vizualizovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Použitý objem |
|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| izolovaná DNA | - | 1 μl |
| Taq DNA polymeráza | 5 U/ μl | 0,04 μl |
| dNTP | 10 mM | 0,4 μl |
| primer RP | 20 μM | 0,5 μl |
| primer LP/LB | 20 μM | 0,5 μl |
| Taq reakční pufr | 10x koncentrovaný | 2 μl |
| dH ₂ O | - | 15,56 μl |

Tabulka č. 4: Složení reakční směsi pro PCR

| Fáze cyklu | Teplota (°C) | Čas (min) |
|----------------------------|--------------|-----------|
| Iniciální denaturace | 95°C | 3:00 |
| Denaturace | 95°C | 0:30 |
| Nasedání primerů | 54°C * | 0:30 |
| Syntetická fáze | 72°C | 1:00 |
| Terminální syntetická fáze | 72°C | 10:00 |
| Ochlazení | 10°C | ∞ |



Tabulka č. 5: Nastavení termocykleru pro genotypování; *teplota nasedání je nastavována podle konkrétních primerů

Návrh primerů

Pro PCR byly použity specifické genotypovací primery. Pro ověření inserce T-DNA v obou alelách genu *KUP5* byla použita dvojice primerů LB (left border primer of T-DNA insertion) a RP (right genomic primer). Primer LB je specifický pro inserční T-DNA. Pokud je T-DNA přítomná, reakce poskytuje produkt o délce 500 – 700 kb. Pro detekci sekvence genu *KUP5* bez inserční T-DNA byla použita dvojice primerů LP (left genomic primer) a RP. V nepřítomnosti T-DNA poskytne tato reakce produkt o délce přibližně 1000 kb. Primery byly navrženy pomocí veřejně dostupného nástroje Primer Design Tool laboratoře SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce č. 6.

| Primer | Sekvence |
|-------------------|--------------------------|
| <i>kup5-1</i> LP* | TCCCAAATCAACTTCCATCAG |
| <i>kup5-1</i> RP* | CAGCAAGAGGCAAGGTAACAC |
| <i>kup5-2</i> LP | TCTCGTAGCATTTGATTGTTGGGA |
| <i>kup5-2</i> RP | CGGTTTCCTTTGTTTACCTGGC |
| <i>kup9-1</i> LP* | AATGTCAGTCTGGCATTACGC |
| <i>kup9-1</i> RP* | ACATGATCGGATTGCTTCTTG |
| LB | ATTTTGCCGATTTCGGAAC |

Tabulka č. 6: Sekvence primerů použitých v PCR pro genotypování; *primery použité Mgr. Štočkovou a Mgr. Šustrem pro genotypování ostatních linií (Štočková, 2020; Šustr, 2015)

3.2.3 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová elektroforéza slouží k rozlišení úseků DNA podle jejich velikosti. Elektroforetický gel byl připraven rozvařením 1,2% w/v agarózy v 0,5xTAE pufru (viz tabulka č. 7). Do rozvařeného gelu bylo přidáno barvivo GelRed (10 µl/100 ml gelu), které umožňuje vizualizaci jednotlivých fragmentů DNA pod UV světlem. Připravený gel byl nalit do formy s hřebenem, který vytvořil budoucí jamky pro nanášení vzorků, ponechán ztuhnout při laboratorní teplotě a přemístěn do elektroforetické vany s 0,5xTAE pufrem. Do zkumavek s PCR produktem (objem 20 µl) byly přidány 4 µl nanášecí barvy 6x Loading Dye (viz tabulka č. 8). Tento nanášecí roztok usnadňuje nanesení vzorků do jamek gelu a umožňuje kontrolovat následný pohyb vzorků gelem. Do každé jamky gelu bylo nanášeno 10 µl vzorku. Do poslední jamky bylo pro určení délky DNA fragmentů nanášeno 1,5 µl DNA markeru (1 kb marker GeneRuler, ThermoScientific). Nakonec byl nastaven proud (400 A) a napětí (70-120 V, v závislosti na velikosti vany). Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z vany a nasnímán pod UV světlem.

| Složka | Koncentrace roztoku | Použité množství |
|-------------------|---------------------|-------------------|
| TRIS base | - | 121 g |
| kyselina octová | 99,8% | 28,5 ml |
| EDTA (pH = 8,0) | 0,5 M | 50 ml |
| dH ₂ O | - | doplnit do 500 ml |

Tabulka č. 7: Složení 0,5x TAE pufru pro elektroforézu

| Složka | Koncentrace roztoku | Použité množství |
|---------------------|---------------------|------------------|
| Tris-HCl (pH = 7,6) | 100 mM | 5 ml |
| bromfenolová modř | - | 0,015 g |
| glycerol | 99,2% | 30,24 ml |
| EDTA (pH = 8,0) | 0,5 M | 6 ml |
| dH ₂ O | - | doplnit do 50 ml |

Tabulka č. 8: Složení nanášecí barvy 6x Loading Dye pro elektroforézu

3.2.4 Křížení

Rostliny ověřené na přítomnost T-DNA v genu *KUP5* byly kříženy s rostlinami divokého typu, ekotyp Col-8 (viz 3.1 Rostlinný materiál). Křížení probíhalo pod binolupou (Olympus SZX7). Na mateřské rostlině bylo vybráno několik zavřených pupat (ostatní květy a šešule byly ostříhány) a očištěno od všech květních částí tak, že zůstal pouze neporušený pestík. Mateřská rostlina pak byla umístěna na 2 dny do kultivační místnosti, kde se pestík dál vyvíjel. Po 2 dnech se z čerstvě rozkvetlých květů otcovské rostliny pinzetou odebralo několik tyčinek. Pyl z těchto tyčinek byl nanesen na pestík mateřské rostliny a ta byla vrácena do kultivační místnosti. Stonek, na jehož vrcholu byl pestík s cizím pylem, byl připevněn ke dřevěné špejli, aby bylo později možné rozeznat šešule, ve kterých by se měla nacházet křížená semena. Tato semena F1 generace byla sklizena a vyseta. Genotypováním byly z F2 generace selektovány homozygotně mutantní i kontrolní rostliny (genotypování konkrétního vzorku bylo provedeno opakovaně pro minimalizaci chybného určení). Jako negativní kontrola pro genotypování byl použit vzorek bez DNA (templátem voda) a jako pozitivní kontrola DNA izolovaná z ekotypu Col-8 (N60000). S *kup5-2* mutantními rostlinami a rostlinami divokého typu byly prováděny kultivační experimenty.

3.3 Transformace rostlin

Rostliny byly transformovány pro bližší charakterizaci transportéru KUP5. Pro transformaci rostlin byla použita metoda MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit (viz 3.3.1 Metoda transformace). Jednotlivé vektory byly množeny v bakterii *Escherichia coli* (DH5α). Do rostlin byly vnášeny pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). Pro obě bakterie probíhala kultivace na tekutém či pevném LB médiu (viz tabulka č. 9). Do média byla přidána specifická antibiotika, která zabránila množení těch bakterií, které nenesly odpovídající vektor. *E. coli* byla kultivována při 37°C, *A. tumefaciens* bylo kultivováno při 28 °C.

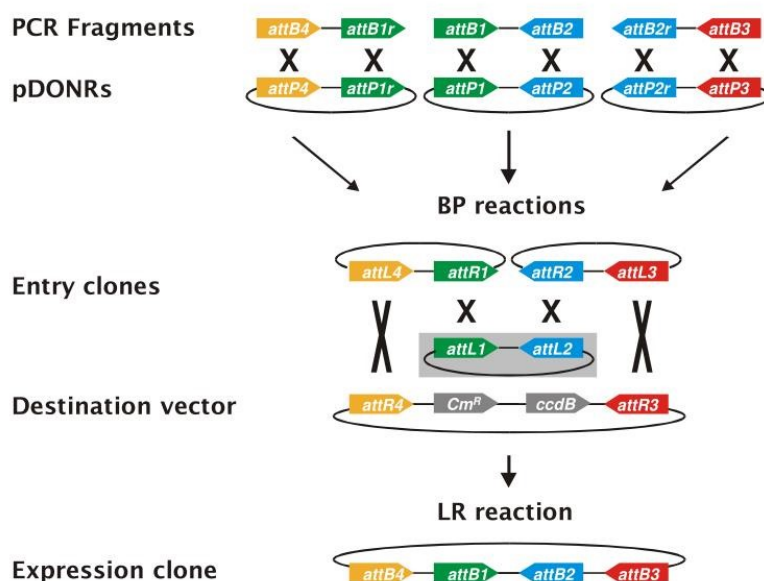
| Složka | Použité množství (g/l) | |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|
| | LB médium tekuté | LB médium tuhé |
| pepton | 10 | 10 |
| kvasničný extrakt | 10 | 10 |
| NaCl | 10 | 10 |
| agar | - | 15 |
| dH ₂ O | doplněna do konečného objemu | doplněna do konečného objemu |

Tabulka č. 9: Složení LB média použitého pro kultivaci bakterií

3.3.1 Metoda transformace

MultiSite Gateway® je metoda, kterou se připravují konstrukty pro transformaci rostlin. Po izolaci genomové DNA se provede amplifikace požadovaných sekvencí, např. promotoru určitého genu nebo kódující sekvence genu. Amplifikace probíhá pomocí PCR za přítomnosti dvou primerů pro každou sekvenci. Primery obsahují specifické adaptorové sekvence potřebné pro amplifikaci konkrétního úseku DNA. Každý amplifikovaný úsek je následně vložen do jednoho donorového vektoru v tzv. BP reakci. Výsledkem BP reakce jsou tzv. Entry clone vektory, kdy jeden vektor nese např. sekvenci promotoru daného genu, další vektor nese kódující sekvenci stejného genu. Entry clone vektory jsou elektroporovány do bakterií *E. coli*, kde se rychle množí. Dalším krokem je tzv. LR reakce, ve které dochází ke spojení všech Entry clone vektorů s destinačním vektorem. Po LR reakci vzniká tzv. Expression clone vektor, který je vhodný pro transformaci rostliny, a je elektroporován do *A. tumefaciens*. Donorové i destinační vektory si nesou rezistenci vůči konkrétním antibiotikům. Toto specifické antibiotikum se přidává do média, na kterém rostou příslušné bakterie. Dá se tak zabránit růstu těch bakterií, které vektor vůbec nenesou či nesou chybně složený vektor. Schéma této metody je ukázáno na obrázku č. 9. Vektory použité v této práci jsou na obrázcích 10-13 (viz 3.3.2 Plán transformací a použité vektory).

MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit



8

invitrogen
Invitrogen Proprietary & Confidential

Obrázek č. 9: Schéma použité metody transformace (<https://www.slideserve.com/amable/the-gateway-cloning-system>)

3.3.2 Plán transformací a použité vektory

Příprava konstruktů *pKUP5::KUP5:term*

Pro přípravu konstruktů *pKUP5::KUP5:term* byl použit Entry clone vektor s promotorem genu *KUP5* (připraven v BP reakci, donorový vektor pDONR P4P1r, viz obrázek č. 10) (Štočková, 2020), Entry clone vektor s kompletní kódující sekvencí genu *KUP5* (připraven v BP reakci, donorový vektor pDONR221, viz obrázek č. 11), Entry clone vektor s terminátorem (donorový vektor pEN-R2-6-L3, viz obrázek č. 12) a destinační vektor pB7m34GW (viz obrázek č. 13). Expression clone vektor s konstruktem *pKUP5::KUP5:term* byl vložen do mutantního pozadí *kup5*. Tato transformace bude sloužit k otestování komplementace mutantního fenotypu.

Příprava konstruktů *pKUP5:GUS*

Pro přípravu konstruktů *pKUP5:GUS* byl použit Entry clone vektor s promotorem pro gen *KUP5* (připraven v BP reakci, donorový vektor pDONR P4P1r, viz obrázek č. 10) (Štočková, 2020) a destinační vektor pGWB633 (<http://shimane-u.org/nakagawa/pgwb-tables/4.htm>) s genem pro GUS. Expression clone vektor s konstruktem *pKUP5::GUS* byl vložen do pozadí Col-0. Tato transformace bude sloužit pro bližší určení lokalizace exprese genu *KUP5* v *A. thaliana*.

Příprava konstruktů *pKUP5::KUP5-GFP*

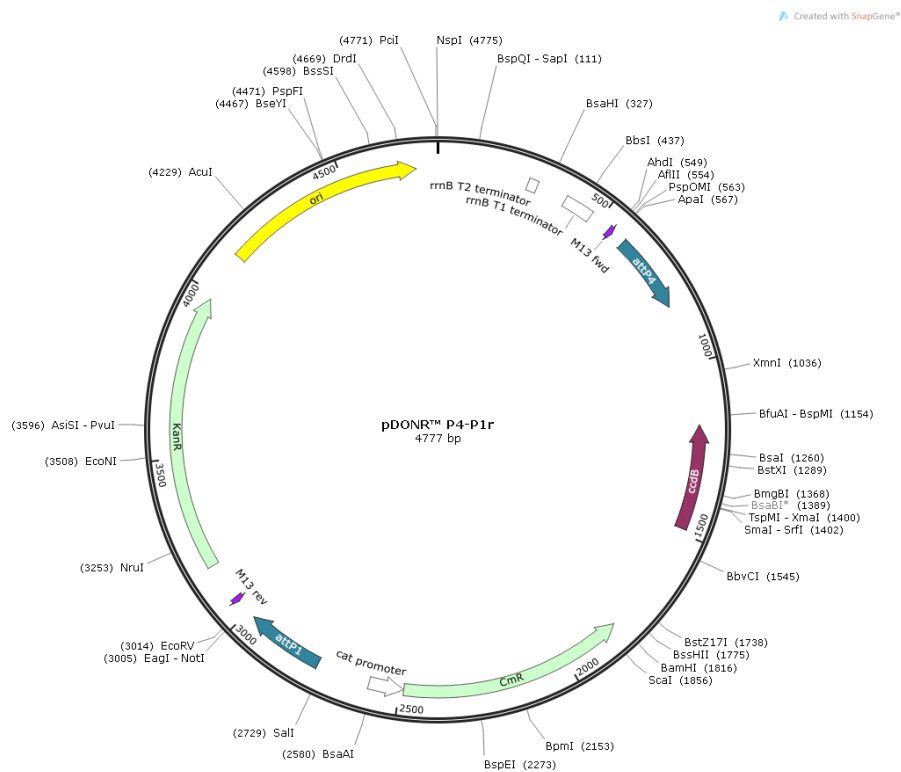
Expression clone vektor s konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP* (GFP připojeno na C konec proteinu) byl již připraven a vložen do pozadí Col-0 (Štočková, 2020). Nově byl tento vektor s konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP* vložen do mutantního pozadí *kup5*. Tato transformace bude sloužit pro otestování komplementace mutantního fenotypu a zároveň pro ověření lokalizace proteinu KUP5 v buňce.

Celkový přehled konstruktů a genetického pozadí transformovaných rostlin uvádí tabulka č. 10. Na obrázcích 10-13 jsou zobrazeny jednotlivé vektory, které byly použity pro transformace.

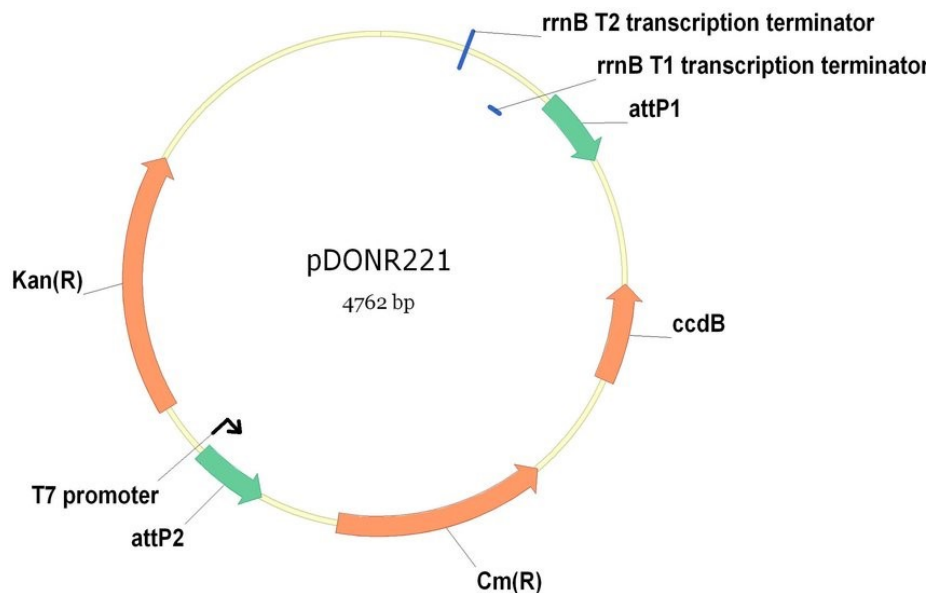
| Genotyp rostliny | Vložený konstrukt |
|------------------|-------------------------|
| wt (Col-0) | <i>pKUP5:GUS</i> |
| wt (Col-0)* | <i>pKUP5::KUP5-GFP*</i> |
| <i>kup5-1</i> | <i>pKUP5::KUP5:term</i> |
| <i>kup5-1</i> | <i>pKUP5::KUP5-GFP</i> |
| <i>kup5-2</i> | <i>pKUP5::KUP5:term</i> |
| <i>kup5-2</i> | <i>pKUP5::KUP5-GFP</i> |

Tabulka č. 10: Přehled plánovaných transformací

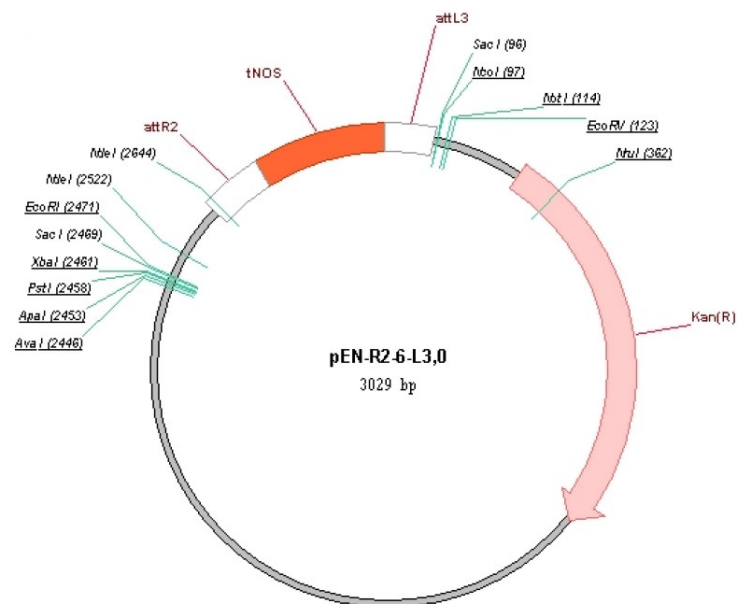
*připraveno Mgr. Štočkovou (Štočková, 2020)



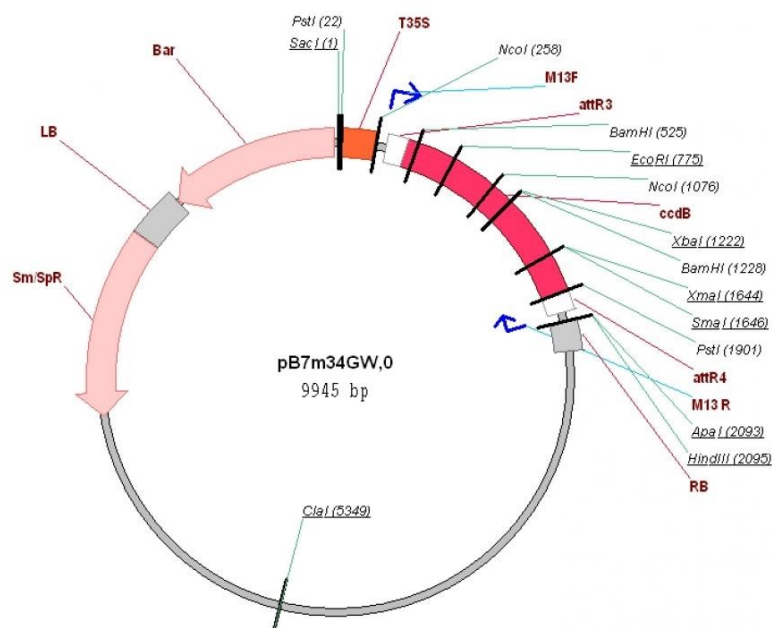
Obrázek č. 10: Donorový vektor pDONR P4P1r (<https://www.addgene.org/71744/>); rezistence: kanamycin



Obrázek č. 11: Donorový vektor pDONR221 (https://www.researchgate.net/figure/Figure-A4-Plasmid-map-of-pDONR221-Entry-vector-for-Gateway-cloning-Invitrogen_fig44_50812240); rezistence: kanamycin



Obrázek č. 12: Donorový vektor pEN-R2-6-L3,0
<https://gatewayvectors.vib.be/index.php/collection/pen-r2-6-l3>; rezistence: kanamycin



Obrázek č. 13: Destinační vektor pB7m34GW
<https://gatewayvectors.vib.be/collection/pb7m34gw0>; rezistence: spectinomycin

3.3.3 Postup práce

Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována dle protokolu Murray and Thompson, 1980. Z cca sedmidenních rostlin byly odebrány části listů, které byly zhomogenizovány (viz 3.2.1 Izolace DNA pro genotypování). Do zkumavek bylo přidáno 0,5 ml 2x CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid; viz tabulka č. 11) a byly vyjmuty nerezové kuličky. Vzorky byly inkubovány celkem 15 min při 65 °C, při 300 kmitech/min. Po vychladnutí byl ke každému vzorku přidán 1 ml směsi chloroform:izoamylalkohol v poměru 24:1. Vzorky byly po promíchání odstředěny (5 min, 14000 ot/min). Poté byl z každého vzorku přenesen cca 0,5 ml horní vodní fáze do čisté zkumavky a byl přidán 1 ml 96% ethanolu. Vzorky byly po dobu 2 min promíchávány. Následovala inkubace vzorků při 4 °C po dobu 15 min a odstředění (5 min, 14000 ot/min). Poté byl odstraněn supernatant, pelety byly promyty 1 ml 70% ethanolu a vzorky odstředěny (10 min, 14000 ot/min). Ethanol byl odstraněn a zkumavky byly vysoušeny po dobu 2 min při 37 °C. Následně bylo přidáno 36 µl sterilní destilované vody a 4 µl 10x koncentrovaného TE pufru. Peleta byla rozpuštěna při 37 °C a 300 kmitech/min během 30 min.

| Složka | Koncentrace |
|------------------------------|------------------------|
| Tris-HCl (pH=8) | 100 mM |
| CTAB | 2 % (w/v) |
| EDTA | 20 mM |
| NaCl | 1,4 M |
| PVP | 2 % (w/v) |
| β merkaptoethanol | 0,2 % (w/v) |
| destilovaná H ₂ O | do požadovaného objemu |

Tabulka č. 11: Složení 2x CTAB pro izolaci DNA

Amplifikace cílových sekvencí DNA

Pro amplifikaci byla využita PCR s použitím proofreading Q5 DNA polymerázy. Pro amplifikaci kompletní kódující sekvence genu *KUP5* (příprava komplementovaných linií) byly použity specifické primery, které obsahovaly adaptorové sekvence attB1 a attB2 (pro

kódující sekvenci genu *KUP5*) důležité pro vložení do donorového vektoru. Sekvence těchto primerů jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Amplifikaci promotorové oblasti genu *KUP5* a amplifikaci kódující sekvence *KUP5* bez stop kodónu (pro přípravu translační fúze s GFP) provedla Mgr. Hana Štočková stejným postupem. Použité amplifikační primery jsou specifikovány v její diplomové práci (Štočková, 2020).

Složení reakční směsi pro Q5 PCR je uvedeno v tabulce č. 13. Objem každé reakce byl 50 μ l. Nastavení termocykleru je uvedeno v tabulce č. 14. Délka fragmentů byla zkontrolována agarózovou gelovou elektroforézou.

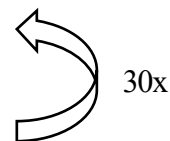
| Primer | Sekvence |
|----------------------------|--|
| KUP5 for attB1 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTT TCACGTGGAAGAAGAA |
| KUP5 rev stop attB2 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATAC CATATAAGTCATTCCAACCTTGCA |

Tabulka č. 12: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci kompletní kódující sekvence genu *KUP5*; adaptorové sekvence attB1 a attB2 sloužící k vložení do donorového vektoru jsou tučně vyznačeny

| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Použitý objem |
|-------------------|-------------------------------|---------------|
| DNA | - | 1 μ l |
| Q5 DNA pol | 2 U/ μ l | 0,25 μ l |
| dNTP | 10 mM | 1 μ l |
| primer R | 20 μ M | 1,25 μ l |
| primer L | 20 μ M | 1,25 μ l |
| 5x Q5 pufr | 5x koncentrovaný | 10 μ l |
| dH ₂ O | - | 35,25 μ l |

Tabulka č. 13: Složení reakční směsi pro PCR s Q5 polymerázou

| Fáze cyklu | Teplota (°C) | Čas (min) |
|----------------------------|--------------|-----------|
| Iniciální denaturace | 98 °C | 0:30 |
| Denaturace | 98 °C | 0:10 |
| Nasedání primerů | 60 °C* | 0:30 |
| Syntetická fáze | 72 °C | 2:30 |
| Terminální syntetická fáze | 72 °C | 2:00 |
| Ochlazení | 10 °C | ∞ |



Tabulka č. 14: Nastavení termocykleru pro PCR s Q5 polymerázou;

*teplota nasedání je nastavována podle konkrétních primerů

BP reakce

BP reakce slouží k vložení PCR produktu (amplifikované sekvence DNA) do donorového vektoru za vzniku Entry clone vektoru. Pro tuto reakci byl použit enzym BP klonáza (Gateway® BP Clonase® II enzyme mix – ThermoFischer Scientific). Enzym zajistí vyštěpení úseku donorového vektoru mezi místy attP1 a attP2 a vložení vlastního PCR produktu mezi tato místa. BP reakci jsem prováděla pouze pro zaklonování kompletní kódující sekvence genu *KUP5*, ostatní BP reakce provedla Mgr. Hana Štočková (Štočková, 2020). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 15. Celkový objem reakce byl 5 µl. Reakce běžela přes noc při teplotě 22°C. Další den byla reakce zastavena přidáním 1 µl proteinkinázy K a inkubována 10 min při 37°C. Produkt BP reakce byl elektroporován do kompetentních buněk *E.coli*.

| Složka | Použitý objem |
|-----------------|---------------|
| PCR produkt | 1 µl |
| donorový vektor | 1,5 µl |
| BP klonáza | 1 µl |
| 10x TE pufr | 1,5 µl |

Tabulka č. 15: Složení reakční směsi pro BP reakci

Elektroporace

Elektroporace slouží ke vnesení vektoru s vlastní sekvencí DNA do buněk bakterií. Po BP reakci byl vektor vnesen do kompetentních buněk *E. coli* (DH5α) (Miller and Nickoloff,

1995). K těmto elektrokompetentním buňkám (cca 40-50 μ l) bylo přidáno 0,2 μ l vektoru a směs byla ponechána 1 min na ledu. Poté bylo 50 μ l této směsi přeneseno do vychlazené elektroporační kyvety a ta byla vložena do elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Aparatur), kde byl vytvořen elektrický výboj s napětím 2500 V a trváním 4-6 ms, čímž došlo k elektroporaci. Do kyvety byl ihned poté přidán 1 ml SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) média (viz tabulka č. 16). Vzorek byl následně přelit do sterilní zkumavky, která byla umístěna do třepačky, kde byl vzorek při 37 °C po dobu 1 hod mírným třepáním (doplnit kmity třepačky) provzdušňován. Po centrifugaci vzorku byla polovina supernatantu odebrána, v jeho zbytku se resuspendovala peleta a obsah zkumavky byl ve FlowBoxu nalit na plotnu s pevným LB médiem a specifickým antibiotikem, zde kanamycinem, v koncentraci 50 μ g/ml. Plotny s bakteriemi byly dnem vzhůru kultivovány při teplotě 37 °C do druhého dne.

| Složka | Koncentrace v médiu | Použité množství |
|-------------------|---------------------|------------------|
| Pepton | 2 % w/v | 0,4 g |
| Kvasniční extrakt | 0,5 % w/v | 0,1 g |
| Glukóza | 20 mM | 0,0721 g |
| NaCl | 10 mM | 0,0117 g |
| KCl | 25 mM | 0,0037 g |
| MgCl ₂ | 10 mM | 0,019 g |
| MgSO ₄ | 10 mM | 0,0241 g |
| dH ₂ O | - | 20 ml |

Tabulka č. 16: Složení SOC média

Colony PCR

Další den, kdy byly na plotnách narostlé kolonie bakterií, byla provedena jejich kontrolní PCR (tzv. Colony PCR – kontrolní PCR z kolonií). Pro ověření úspěšnosti zaklonování vektoru do bakterií byly využity primery s označením M13, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 17. Tyto primery jsou specifické tím, že nasedají do vektoru na konkrétní místa, mezi nimiž se nachází amplifikovaná část DNA. Náhodně bylo vybráno 20 kolonií, které se otestovaly. Část kolonie byla z plotny do mikrozkuavky s reakční směsí (viz tabulka č. 18) přenesena vždy sterilně ve FlowBoxu pomocí pipety se sterilní špičkou. Byla také provedena negativní kontrola, kdy jsem se sterilní špičkou dotkla média mimo všechny

kolonie. Každá reakce měla celkový objem 20 μ l. Nastavení termocykleru je uvedeno v tabulce č. 19.

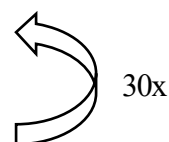
| Primer | Sekvence |
|--------------------|-------------------|
| M13 F (-20) primer | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 R (-26) primer | CAGGAAACAGCTATGAC |

Tabulka č. 17: Sekvence M13 primerů použitých v colony PCR po BP reakci

| Složka | Koncentrace zásobního roztoku | Použitý objem |
|--------------------|-------------------------------|---------------|
| DNA | - | 0 μ l |
| Taq DNA polymeráza | 5 U/ μ l | 0,04 μ l |
| dNTP | 10 mM | 0,4 μ l |
| Primer M13 fw | 20 μ M | 0,5 μ l |
| Primer M13 rv | 20 μ M | 0,5 μ l |
| Taq reakční pufr | 10x koncentrovaný | 2 μ l |
| dH ₂ O | - | 16,56 μ l |

Tabulka č. 18: Složení reakční směsi pro colony PCR

| Fáze cyklu | Teplota (°C) | Čas (min) |
|----------------------------|--------------|-----------|
| Iniciální denaturace | 95 °C | 3:00 |
| Denaturace | 95 °C | 0:30 |
| Nasedání primerů | 50 °C* | 0:30 |
| Syntetická fáze | 72 °C | 1:00 |
| Terminální syntetická fáze | 72 °C | 10:00 |
| Ochlazení | 10 °C | ∞ |



Tabulka č. 19: Nastavení termocykleru pro colony PCR po BP reakci;

*teplota nasedání je nastavována podle konkrétních primerů

Produkty PCR a jejich správná délka byla zkontrolována pomocí agarózové elektroforézy. Každá pozitivně testovaná kolonie byla zaočkována do 3 ml tekutého LB média pro další rozmnožení bakterií. Přidány byly také 3 μ l kanamycinu (50 mg/ml). Zkumavky byly vloženy nakloněné do třepačky, kde se bakterie kultivovaly při 37 °C do zakalení roztoku (12-24 hod). Po zakalení roztoku se z narostlých bakterií izolovaly vektory - připravily se

tzv. MiniPrepy podle protokolu výrobce (Zymo Research Plasmid MiniPrep Classic). Následně se určila koncentrace DNA každého vzorku.

Kontrolní restrikce

Za použití vhodného restrikčního enzymu a příslušného pufru byla provedena kontrolní restrikce izolovaných vektorů. Vhodný enzym a místa štěpení byla určena pomocí programu Geneious 11.0.5 (Biomatters). Enzym by měl štěpit samotný vektor i amplifikovanou sekvenci v něm. Fragmenty, na které enzym celý konstrukt rozštěpí, by měly mít různou velikost, aby bylo možné je následně rozlišit. Pro Entry clone vektor nesoucí kompletní kódující sekvenci genu *KUP5* byl použit enzym TaqI restriktáza. Restrikce proběhla v termocykleru. Pro tento enzym byla nastavena teplota 65 °C po dobu 1 hod a 80 °C po dobu 20 min. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 20. Celkový objem reakce byl 20 µl.

| Složka | Použitý objem |
|--------------------------|---------------|
| DNA | 0,5 µl * |
| TaqI restriktáza | 0,2 µl |
| reakční pufr (Cut Smart) | 2 µl |
| dH ₂ O | 17,3 µl |

Tabulka č. 20: Složení reakční směsi pro kontrolní restrikci;
*při koncentraci DNA 400 ng/µl

Sekvenace

Po úspěšné kontrolní restrikci byly pro finální kontrolu zaklonovaného úseku amplifikované DNA vzorky odeslány na sekvenaci (Biogen Praha – GATC). Celkový objem jednoho vzorku byl 10 µl. Vzorky byly připraveny dle požadavků laboratoře Genseq s.r.o. (<http://www.genseq.cz/>) - v mém případě každý vzorek obsahoval 1 µl DNA, 1,25 µl primeru a 7,75 µl dH₂O). Vzhledem k délce kódující sekvence genu *KUP5* byly kromě dvou primerů M13 použity také dva primery specifické právě pro tuto sekvenci. Jednotlivé primery jsou uvedeny v tabulce č. 21.

| Primer | Sekvence |
|--------------------|------------------------|
| M13 F (-20) primer | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 R (-26) primer | CAGGAAACAGCTATGAC |
| KUP5 orf seq1 | CTTCTTCTGATTTTAGTTCTTG |
| KUP5 orf seq2 | CTTACTTTTATCCTTCTGGT |

Tabulka č. 21: Sekvence jednotlivých primerů použitých pro sekvenaci kódující sekvence genu *KUP5*

LR reakce

Po úspěšné sekvenaci následovala tzv. LR reakce, ve které došlo ke spojení příslušných Entry clones vektorů s jedním destinačním vektorem. Vzniklý vektor, tzv. Expression clone, byl následně použit pro samotnou transformaci rostlin.

Pro LR reakci byl použit enzym LR klonáza (Gateway® LR Clonase® II enzyme, ThermoFischer Scientific) ve sterilním TE pufru (pH=8). Na reakci byl použit 1 µl tohoto enzymu. Vektory byly do reakční směsi přidávány v poměru 1:1 (destinační vektor:vstupní vektor) podle jejich délky (bp) a jejich koncentrace. Celkový objem reakce byl 5 µl. LR reakce proběhla přes noc při 22°C. Druhý den byla reakce zastavena přidáním 1 µl proteinkinázy K. Následně proběhla 10 min inkubace při 37°C. Produkt byl elektroporován do kompetentních buněk *E. coli*.

Postup po LR reakci

Postup po LR reakci byl stejný jako po BP reakci. Produkt LR reakce byl elektroporován do kompetentních buněk *E. coli* (DH5α) (viz Elektroporace). Pevné agarové médium pro kultivaci bakterií v tomto případě obsahovalo antibiotikum spectinomycin, který byl přidán v koncentraci 50 µg/ml. Následovala kontrolní PCR (viz Colony PCR), kde byly použity specifické primery (viz tabulka č. 22). Čas syntetické fáze byl nastaven podle délky amplifikovaného úseku.

| Varianta | Primer | Sekvence |
|-------------------------|---------------|----------------------|
| <i>pKUP5::KUP5:term</i> | KUP5 prom seq | TCCTGTTTCCTTGGATCAGA |
| | KUP5 cds rev | ACCAACTCCAACCTTCAGAC |
| <i>pKUP5::GUS</i> | KUP5 prom seq | TCCTGTTTCCTTGGATCAGA |
| | GUS rev | TCTGCCAGTTCGTTGTTC |

Tabulka č. 22: Sekvence primerů použitých pro detekci konstruktů *pKUP5::KUP5:term* a *pKUP5::GUS* v rostlinách (colony PCR po LR reakci)

Dále bylo provedeno zaočkování pozitivně testovaných kolonií do 3 ml tekutého LB média s 3 µl spectinomycinu (50 mg/ml), příprava MiniPrepů (Zymo Research Plasmid MiniPrep Classic) a kontrolní restrikce (viz Kontrolní restrikce), kde byly pro konstrukt *pKUP5::KUP5:term* použity restrikční enzymy PstI, PvuII (teplota 37 °C a 80 °C) a reakční pufr 3.1 (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA - bovine serum albumin; BioLabs, NEB Restriction Enzymes) a pro konstrukt *pKUP5::GUS* byl použit enzym HindIII (teplota 37 °C a 80 °C) a reakční pufr 2.1 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA - bovine serum albumin; BioLabs, NEB Restriction Enzymes). Po úspěšné sekvenaci byl Expression clone vektor elektroporován do *A. tumefaciens* (viz Elektroporace). Při elektroporaci do *A. tumefaciens* byl použit elektrický výboj 2000 V a ke vzorku byl následně přidán 1 ml Yeb Recovery média (viz tabulky č. 23 a 24). Vzorky byly ve sterilních zkumavkách umístěny do třepačky, kde byly 2 hod při 28 °C provzdušňovány.

| Složka | Použité množství |
|-------------------|------------------|
| NaCl | 2,922 g |
| MgCl ₂ | 1,0167 g |
| KCl | 93,19 mg |
| MgSO ₄ | 1,2324 g |
| dH ₂ O | 50 ml |

Tabulka č. 23: Složení roztoku Recovery soli pro Yeb Recovery médium

| Složka | Použité množství |
|-------------------|------------------|
| Pepton | 5 g |
| Kvasničný extrakt | 0,5 g |
| MgSO ₄ | 1 g |
| Sacharóza | 2,5 g |
| dH ₂ O | 650 ml |

Tabulka č. 24: Směs pro vytvoření plnohodnotného Yeb Recovery média

Bakterie byly kultivovány na tuhém LB médiu s antibiotiky gentamycinem (c=10 mg/ml; 200 µl/200 ml média), rifampicinem (c=10 mg/ml; 2 ml/200 ml média) a spectinomycinem (c=50 mg/ml; 200 µl/200 ml média) po dobu 2 dnů při 28 °C. Po provedení Colony PCR (viz Colony PCR), zaočkování pozitivně testovaných kolonií a kultivaci bakterií byla z části pozitivní kolonie připravena tzv. konzerva. Bylo odebráno 400 µl vzorku, přidáno 100 µl sterilního 50% glycerolu a celá zkumavka se okamžitě zmrazila v tekutém dusíku. Takto připravené konzervy byly skladovány při -80°C. Ze zbytku vzorku se připravila suspenze pro samotnou transformaci rostlin.

Metoda floral dip – vnesení konstruktů do rostliny

Tato metoda spočívá v namáčení poupat rostlin příslušného genotypu v suspenzi *A. tumefaciens*. Tyto bakterie nesoucí připravený konstrukt s určitou sekvencí kolonizují poupata rostlin a příslušný konstrukt je vnesen do rostlinné DNA.

Pro přípravu suspenze *A. tumefaciens* byl zbytek vzorku přelit do 50 ml tekutého LB média s příslušnými antibiotiky a následně byl kultivován do zakalení při 28°C. Po zakalení (po 24-48 hod) tekutého LB média s *A. tumefaciens* byl vzorek centrifugován po dobu 20 min při 5000 g. Supernatant byl odsát a peleta byla rozpuštěna ve 20 ml infiltračního média (viz tabulka č. 25). Nadzemní část rostliny byla máčena v infiltračním médiu s *A. tumefaciens* po dobu 3 s (máčí se její kvetoucí stvoly, případné šesule musí být před samotným máčením odstraněny). Nadzemní část byla zabalena do plastového sáčku a ponechána do druhého dne ve tmě. Další den byl z rostliny odstraněn sáček a ta byla umístěna do kultivační místnosti.

| Složka | Použité množství |
|--------------------------|------------------|
| 5% sacharóza | 1 g |
| 0,05 % Silwet (smáčedlo) | 10 µl |
| dH ₂ O | 20 ml |

Tabulka č. 25: Složení infiltračního média pro transformaci rostlin

Selekce transformovaných rostlin

Po sklizení semen z transformovaných rostlin byla provedena jejich sterilizace, a to plynným chlórem. Práce probíhala v digestoři. Do exsikátoru byl vložen stojánek

s otevřenými mikrozkuřavkami plnými semen. Pak byla do exsikátoru vložena kádinka s 50 ml přípravku s chlornanem sodným (SAVO), přidal se 1,5 ml koncentrované HCl a exsikátor byl uzavřen. Sterilizace probíhala 4 hod.

Semena byla vyseta na sterilní zeminu a umístěna do kultivační místnosti. U cca týden starých semenáčků byla provedena první selekce – aplikovalo se selekční činidlo, herbicid BASTA (zásobní roztok o 150 g/l se ředí 1000x vodou, výsledná koncentrace = 150 mg/l). Postřik byl aplikován 3-4x v intervalech po 1 týdnu. Rostliny, které přežily, byly přesazeny na pelety, dopěstovány a následně z nich byla sklizena transformovaná semena. Z těchto semen byly vypěstovány rostliny, které byly genotypovány. S vybranými liniemi, které obsahovaly vložený konstrukt, byly prováděny kultivace *in vitro*.

3.4 Kultivační experimenty

Kultivační experimenty byly prováděny s transformovanými rostlinami a s mutantními liniemi *kup5-1*, *kup5-2* a *kup9*. Byly prováděny za různých podmínek dle potřeb jednotlivých experimentů.

3.4.1 Kultivační média

Jako základní médium pro předpěstování a zároveň jako kontrolní médium bylo použito 0,2xMS (Murashige-Skoog) médium, značeno podle obsahu K^+ jako 4 mM K^+ médium. Toto médium bylo odvozeno od plného MS média a obsahovalo 20% obsahu živin plného MS média. Dále bylo od 0,2xMS média odvozeno médium s nízkým obsahem K^+ , značeno jako 15 μM K^+ médium, na kterém byly rostliny vystaveny stresu z nízké dostupnosti K^+ . Pro zajištění nízké dostupnosti K^+ byly v tomto médiu nahrazeny draselné soli solemi sodnými. U každého média bylo pomocí NaOH upraveno jeho pH na 5,8. Složení obou médií je uvedeno v tabulce č. 26.

| sloučenina v médiu | koncentrace látky v médiu (μM) | |
|---|---|--------------------------------------|
| | 4 mM K^+ médium | 15 μM K^+ médium |
| KNO_3 | 3758,65 | 0,00 |
| NaNO_3 | 0,00 | 3752,94 |
| KH_2PO_4 | 249,83 | 0,00 |
| NaH_2PO_4 | 0,00 | 250,04 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 300,18 | 300,18 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 598,56 | 598,56 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 20,00 | 20,00 |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ | 20,02 | 20,02 |
| H_3BO_4 | 20,05 | 20,05 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,02 | 0,02 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,02 | 0,02 |
| MnSO_4 | 22,38 | 22,38 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,21 | 0,21 |
| KI | 1,00 | 1,00* |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5,98 | 5,98 |
| 10mM KCl | 0,00 | 0,40* |

Tabulka č. 26: Složení médií použitých při kultivačních experimentech; *zbytek K^+ v 15 μM K^+ médiu obsahuje použitý agar (13,6 μM)

3.4.2 Kultivace rostlin *in vitro*

V kultivacích *in vitro* bylo použito médium 4 mM K^+ médium a 15 μM K^+ médium (viz tabulka č. 26) s přidavkem 1% (w/v) sacharózy a 1% (w/v) agaru. Pro 15 μM K^+ médium byl použit agar s nižším obsahem K^+ (Duchefa) oproti obsahu K^+ v agaru použitém v 4 mM K^+ médiu (Kobe). Obsah K^+ v agaru byl také brán v potaz při dávkování draselných solí do média. Po úpravě pH byla média po dobu cca 1 hod sterilizována v autoklávu (Tuttnauer, model 2540MK).

Za účelem zajištění sterilních podmínek byla veškerá práce prováděna v laminárním boxu (FlowBox). Semena byla před vysetím 15 min sterilizována tzv. dezinfekčním roztokem (20% chlornan sodný – SAVO a 1% triton) a následně byla 3x propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Pak byla vyseta na čtvercové Petriho misky s pevným agarovým

4 mM K⁺ médiem, kde byly rostliny předpěstovány. Na jednu plotnu byly vždy vysety oba genotypy, mutantní i divoká forma. Od každého genotypu bylo na jednu plotnu vyseto 30 semen. Semena byla nejprve vernalizována. Za tímto účelem byly plotny se semeny umístěny na 3 dny do lednice, do teploty 4 °C a do tmy. Po uplynutí 3 dnů byly plotny přemístěny do kultivační místnosti s teplotou 22 °C a fotoperiodou 16 hod světlo, 8 hod tma. Po vyklíčení, kdy kořenový systém rostlin dosáhl velikosti cca 1 cm (po 3-4 dnech), byly rostliny ve FlowBoxu přesazeny na čtvercové plotny s pevným agarovým 4 mM K⁺ médiem a 15 μM K⁺ médiem. Následně byly umístěny do stejných kultivačních podmínek. Rostliny kultivované *in vitro* byly následně odebrány pro hodnocení jejich růstového fenotypu, detekce GUS aktivity nebo lokalizace proteinu KUP5 v buňce.

3.4.3 Kultivace rostlin v substrátu

Za účelem zhodnocení odolnosti *kup5* a *kup9* mutantních rostlin vůči suchu byly tyto rostliny a jejich divoké formy pěstovány v substrátu. Jako substrát byla použita sterilizovaná a navlhčená kompostová zem smíchaná s křemičitým pískem v poměru 1:1. Semena byla před vysetím 15 min sterilizována tzv. dezinfekčním roztokem (20% chlornan sodný – SAVO a 1% triton) a následně byla 3x propláchnuta destilovanou vodou. Po sterilizaci byla vernalizována v lednici při 4 °C po dobu 3 dnů. Semena byla vyseta do malých květináčů (5x5 cm) s přibližně stejným množstvím substrátu (množství substrátu bylo do každého květináče naváženo), aby se zabránilo následnému rozdílu ve vysychání květináčů. Rostliny byly kultivovány při teplotě 23 °C, relativní vzdušné vlhkosti 45% a fotoperiodě 16 hod světlo, 8 hod tma. Po 3 týdnech byl proveden 1. odběr (varianta T1), kdy byly odebrány prýty a byla zvážena jejich čerstvá hmotnost (FW - fresh weight). Po několika dnech v sušárně (60 °C) byla zvážena i suchá hmotnost prýtů (DW – dry weight). Z těchto dvou parametrů mohl být vypočítán relativní obsah vody (RWC – relative water content). Zbývající květináče byly rozděleny na dvě skupiny – jedna skupina (varianta T2-zálivka) byla dále zalévána cca 600 ml destilované vody 2x týdně, druhá skupina (varianta T2-sucho) nebyla zalévána vůbec. Kultivace probíhala za stejných podmínek. Zhruba po 7-10 dnech, kdy byl vidět patrný rozdíl mezi zalévanými a nezalévanými rostlinami, byla u všech zbývajících rostlin určena FW, DW a RWC.

V rámci diplomové práce byly takto provedeny tyto experimenty:

1. experiment - odolnost *kup5* mutantů vůči suchu

Pro tento experiment bylo použito celkem 40 květináčů. Do každého květináče byla vyseta 4 semena stejného genotypu. Celkem bylo tedy 20 květináčů s rostlinami divokého typu a 20 květináčů s rostlinami mutantními. Na počátku experimentu byly květináče pravidelně zalévány cca 600 ml destilované vody 2x týdně. Po provedení 1. odběru byly zbývající květináče rozděleny na dvě skupiny, zalévané (varianta T2-zálivka) a nezalévané (varianta T2-sucho). Další kultivace probíhala za stejných podmínek. Následně byly odebrány i zbývající rostliny.

2. experiment – odolnost *kup5* mutantů vůči suchu

Uspořádání 1. experimentu se ukázalo jako neefektivní – i přes dávkování stejného množství substrátu vysychaly květináče nerovnoměrně, tudíž nebylo zřejmé, zda není výsledný rozdíl mezi genotypy způsoben právě tímto faktorem. Experiment byl tedy proveden znovu a byl upraven tak, že byl každý květináč rozdělen pomyslnou čarou na dvě poloviny – do jedné poloviny byla naseta mutantní semena, do druhé poloviny byla naseta semena divokého typu. Nasetím semen obou genotypů do jednoho květináče bylo zajištěno, že případný rozdíl mezi oběma genotypy nebude způsoben právě rozdílným vysycháním květináčů. Ve výsledku tedy obsahoval jeden květináč 4 rostliny – 2 mutanty *kup5-1* a 2 rostliny divokého typu. Další postup a kultivační podmínky byly stejné jako v 1. experimentu.

3. experiment – odolnost *kup9* mutantů vůči suchu

Uspořádání experimentu a kultivační podmínky byly stejné jako ve 2. experimentu.

3.4.4 Hydroponická kultivace

Pro ověření hypotézy role transportéru KUP9 v translokaci K^+ floémem a efektivitě floémového toku byly mutantní rostliny *kup9* s jejich divokou formou kultivovány v hydroponii v podmínkách různé fotoperiody a různé ozáření. V případě zapojení transportéru KUP9 do floémového toku by měly podmínky různé ozáření navodit prohloubení pozorovaného růstového fenotypu. Jednotlivé ozáření byly měřeny pomocí

přístroje FluorPen. Všechny tyto experimenty jsem prováděla společně s Mgr. Markem Šustrem.

V hydroponické kultivaci bylo použito 4 mM K⁺ médium a 15 μM K⁺ médium (viz tabulka č. 26) bez přídavku agaru a sacharózy. Pro hydroponii byly použity nádoby Araponics, které měly zajištěno vzduchování. Každá nádoba byla na začátku experimentu naplněna 4 mM K⁺ médiem (objem 2 l). V tomto médiu byly semenáčky pěstovány cca 14 dní (viz detaily jednotlivých experimentů), než dosáhly minimální velikosti. Poté bylo v některých nádobách pro potřeby jednotlivých experimentů nahrazeno kontrolní médium stejným množstvím 15 μM K⁺ média. V každé nádobě bylo médium měněno jednou za týden.

Semena byla před vysetím 15 min sterilizována tzv. dezinfekčním roztokem (20% chlornan sodný – SAVO a 1% triton) a následně byla 3x propláchnuta destilovanou vodou. Po sterilizaci byla vernalizována v lednici při 4 °C po dobu 3 dnů. Poté byly vyplněny všechny jamky v nádobách agarovým roztokem, který byl připraven rozvařením 100 ml dH₂O s 0,6 g agaru. Do každé jamky s agarem byla naseta 2 semena (jedno sloužilo jako rezerva). Nádoby byly umístěny do kultivační místnosti s teplotou 23 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 62%. Fotoperioda a ozáření byla upravena podle potřeb jednotlivých experimentů. Na závěr každého experimentu byly z rostlin odebrány prýty a kořeny, jejichž čerstvá hmotnost (FW) byla zvážena na analytických vahách. Po vysušení částí rostlin v sušárně (60 °C) byla zvážena i jejich suchá hmotnost (DW). Z těchto dvou parametrů byl vypočítán relativní obsah vody (RWC).

V rámci diplomové práce byly takto provedeny tyto experimenty:

1. experiment – reakce *kup9* mutantů na fotoperiodu dlouhého dne

V tomto experimentu byla do 2 nádob naseta semena rostlin divokého typu a do dalších 2 nádob semena mutantů *kup9*. Po dobu 14 dnů byly rostliny kultivovány na 4 mM K⁺ médiu, při ozáření 110 μmol/m²/s PAR (fotosynteticky aktivní radiace) a při fotoperiodě 16 hod světlo, 8 hod tma. Po 14 dnech bylo u poloviny rostlin každého genotypu vyměněno 4 mM K⁺ médium za 15 μM K⁺ médium. Rostliny byly kultivovány další cca 3 týdny.

2. experiment – reakce *kup9* mutantů na fotoperiodu krátkého dne

V tomto experimentu byla do 2 nádob naseta semena rostlin divokého typu a do dalších 2 nádob semena mutantů *kup9*. Po dobu 14 dnů byly rostliny kultivovány na

4 mM K⁺ médiu, při ozáření 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a při fotoperiodě 8 hod světlo, 16 hod tma. Po 14 dnech bylo u poloviny rostlin každého genotypu vyměněno 4 mM K⁺ médium za 15 μM K⁺ médium. Rostliny byly kultivovány další cca 4 týdny.

3. experiment – reakce *kup9* mutantů na nízkou ozáření

V experimentu s nízkou ozáření byla do 2 nádob naseta semena rostlin divokého typu a do dalších 2 nádob semena mutantů *kup9*. Po dobu 14 dnů byly rostliny kultivovány na 4 mM K⁺ médiu, při ozáření 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a při fotoperiodě 8 hod světlo, 16 hod tma. Po 14 dnech bylo u poloviny rostlin každého genotypu vyměněno 4 mM K⁺ médium za 15 μM K⁺ médium. Ozáření nádob byla následně snížena netkanou textilií na 65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a rostliny byly takto kultivovány další cca 4 týdny.

4. experiment – reakce *kup9* mutantů na nízkou ozáření

Ve 3. experimentu se rostlinám nedařilo, do celkového hodnocení jich bylo pouze 12 od každé varianty, proto byl experiment opakován. Všechny podmínky byly stejné jako ve 3. experimentu, došlo pouze k mírnému upravení designu experimentu - do každé nádoby byla naseta semena obou genotypů. Bylo tak zabráněno tomu, že v případě kontaminace nádoby cizím organismem by bylo velké množství rostlin jednoho genotypu nepoužitelné pro výsledné hodnocení. Mírně byla také upravena ozáření v porovnání se 3. experimentem. Ozáření byla snížena netkanou textilií na 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a rostliny byly takto kultivovány další cca 4 týdny.

5. experiment – reakce *kup9* mutantů na vysokou ozáření

V experimentu s vysokou ozáření byla semena opět naseta ve variantě obou genotypů do každé nádoby. Po dobu 3 týdnů byly rostliny kultivovány na 4 mM K⁺ médiu, při ozáření 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a při fotoperiodě 8 hod světlo, 16 hod tma. Po 3 týdnech kultivace bylo u poloviny rostlin každého genotypu vyměněno 4 mM K⁺ médium za 15 μM K⁺ médium. Následně byly rostliny přesunuty na fotoperiodu 16 hod světlo, 8 hod tma a ozáření byla postupně zvyšována (270 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ na 5 dní, 370 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ na 5 dní, 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ na 5 dní). Rostliny byly tedy na zvýšené ozáření kultivovány dalších 15 dní.

3.5 Analýza rostlin kultivovaných *in vitro*

3.5.1 Analýza růstového fenotypu

Růstový fenotyp byl hodnocen u *kup5-1* a *kup5-2* mutantních rostlin. Hodnocení růstu kořenového systému bylo prováděno pomocí analýzy obrazu. Rostliny kultivované *in vitro* na agarovém médiu (4 mM K⁺ médium a 15 μM K⁺ médium) byly v průběhu kultivace, nejpozději však ve chvíli, kdy se kořeny ještě těsně nedotýkaly spodního okraje misky, skenovány pomocí skeneru Epson V800 Photo (při 48bitových barvách a rozlišení 1200 dpi). V programu NIS-Elements AR 3.2 64bit pak byly pomocí ovladače Root Analyzer měřeny kořeny těchto rostlin (celková délka kořenového systému, délka hlavního kořene, délka a počet postranních kořenů).

Pro hodnocení produkce biomasy *kup5-2* mutantních rostlin kultivovaných *in vitro* byly odebrány prýty a kořeny těchto rostlin. Prýty i kořeny byly zváženy na analytických vahách a bylo porovnáno množství biomasy mezi rostlinami mutantního a divokého genotypu. Byla stanovena FW, DW a RWC podobně jako u rostlin kultivovaných v hydroponii nebo substrátu.

3.5.2 Mikroskopická analýza růstových parametrů

Pro hodnocení detailních růstových parametrů *kup5-1* mutantních rostlin byly rostliny minimálně po dobu 2 hod fixovány 4% roztokem formaldehydu. Následně byly promyty fosfátovým pufrem (pH=7, c=0,1M) a odvzdušněny pomocí olejové vývěvy po dobu minimálně 1 hod. Následně byly opakovaně opláchnuty fosfátovým pufrem, ve kterém byly ponechány po dobu 15 min. K rostlinám byl postupně přidáván roztok glycerolu v různých koncentracích. Každý se nechal působit 1 hod a následně byl nahrazen koncentrovanějším roztokem. Postupně byly rostliny převedeny do 65% roztoku glycerolu. V jednotlivých krocích byl použit 15% glycerol s 2% DMSO (dimethylsulfoxid), 30% glycerol s 2% DMSO, 50% glycerol s 0,1% tritonem a 65% glycerol s 2% DMSO.

Následně byly z celých rostlin vytvořeny tzv. whole-mount preparáty (Soukup and Tylová, 2014). Na podložní skříčka byly po obou koncích přilepeny proužky parafilmu. Zabránilo se tak poškození buněk kořenů po přiklopení krycími skříčky. Na skříčko se napipetovalo 90-120 μl projasňovacího roztoku (viz tabulka č. 27), do kterého byly rostliny pomocí štětečku opatrně přeneseny a rozprostřeny. Připravené preparáty byly následně pozorovány

pod mikroskopem za účelem měření velikosti buněk primární kůry kořene, celkové délky hypokotylů, velikosti buněk pokožky hypokotylů a aktivity kořenových meristémů.

Pro měření velikosti buněk hypokotylů a celkové délky hypokotylů byl použit mikroskop Olympus BX51 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) s kamerou Apogee U4000 (Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA). Byly měřeny buňky po obou stranách a po celé délce hypokotylu. Pro měření velikosti buněk kořenů a aktivity meristémů byl použit mikroskop Nikon Exlipse i90 s kamerou Andor Zyla. Velikost byla měřena u buněk primární kůry kořene (vždy od místa první diferencované protoxylémové cévy směrem k bázi kořene). Pro každý kořen bylo změřeno celkem 10 buněk. Aktivita meristémů byla měřena jako délka meristematické zóny kořene. Měření bylo prováděno manuálně s pomocí programu NIS Elements AR 3.2 64bit.

| Složka | Použité množství |
|---|------------------|
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 0,04 g |
| 65% glycerol | 20 ml |
| NaI | 17 g |
| 2% DMSO | 0,4 ml |

Tabulka č. 27: Složení projasňovacího roztoku pro přípravu mikroskopických preparátů

3.5.3 Detekce aktivity GUS

Se semeny z rostlin Col-0 transformovaných konstruktem *pKUP5:GUS* byly provedeny kultivace *in vitro* na agarovém 4 mM K⁺ médiu. Pro zhodnocení, zda se lokalizace genu *KUP5* mění v rámci vývoje rostliny, byly rostliny kultivovány a následně odebrány po 4, 7, 10 a 14 dnech. Rostliny byly fixovány v jamkách ve 3 ml vychlazeného 90% acetonu po dobu 30 min. Po promytí promývacím pufrem (viz tabulka č. 28) a odvzdušnění byl do každé jamky přidán 1 ml barvicího roztoku (viz tabulka č. 28). Rostliny v něm byly ponechány při pokojové teplotě a ve tmě do druhého dne. Následně byly rostliny postupně převedeny z barvicího roztoku do projasňovacího roztoku. V jednotlivých krocích byl použit 15% glycerol s 2% DMSO, 30% glycerol s 2% DMSO, 50% glycerol s 0,1% tritonem a 65% glycerol s 2% DMSO. V každém roztoku glycerolu byly rostliny ponechány 30 min. Z roztoku 65% glycerolu byly rostliny převedeny do projasňovacího

roztoku (viz tabulka č. 27) a byly vytvořeny tzv. whole-mount preparáty. Rostliny byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX51 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) s kamerou Apogee U4000 (Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA).

| | PROMÝVACÍ PUFR (50 ml) | BARVÍČÍ ROZTOK (20 ml) |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| Složka | Použité množství | Použité množství |
| 50 mM ferrokyanid | 500 µl | 200 µl |
| 50 mM ferrikyanid | 500 µl | 200 µl |
| 0,1 M NaPO ₄ , pH=7 | 49 ml | 19,4 ml |
| 20 mg/ml X-gluc | - | 200 µl |

Tabulka č. 28: Složení promývacího pufru a barvicího roztoku pro detekci GUS aktivity

3.5.4 Lokalizace proteinu KUP5 v buňce

Se semeny z rostlin Col-0 transformovaných konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP* byly provedeny kultivace *in vitro*. Rostliny byly pěstovány na agarovém 4 mM K⁺ médiu po dobu 5 dnů. Za účelem ověřit lokalizaci KUP5 v ER (Štočková, 2020) a zjistit, zda se lokalizace proteinu KUP5 nemění v podmínkách nízké dostupnosti K⁺, byly rostliny přesazeny na 1 nebo 2 dny na 15 µM K⁺ médium. Následně byly rostliny pozorovány pod mikroskopem v laboratoři Dr. Fendrycha - vertikální fluorescenční mikroskop CSU-W1 se softwarem VisiView 4.4.0.14 (Visitron Systems). V tomto případě byla snímána emise u GFP 520 nm. Fotografie byly zpracovány v programu Image-J. K ověření lokalizace proteinu KUP5 v buňce byla vytvořena také transgenní linie *pKUP5::KUP5-GFP* v mutantním pozadí *kup5*.

3.6 Statistické vyhodnocení

Statistika byla prováděna v programu NCSS 9, verze 9.0.15 (Hintze, J. (2013), NCSS 9. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com). Pro hodnocení vlivu dvou parametrů (genotyp a varianta média) byla použita GLM ANOVA a Bonferroni Multiple Comparison Test. Pro hodnocení pouze jednoho parametru (genotyp) byla použita One Way ANOVA a Bonferroni Multiple Comparison Test.

4 Výsledky

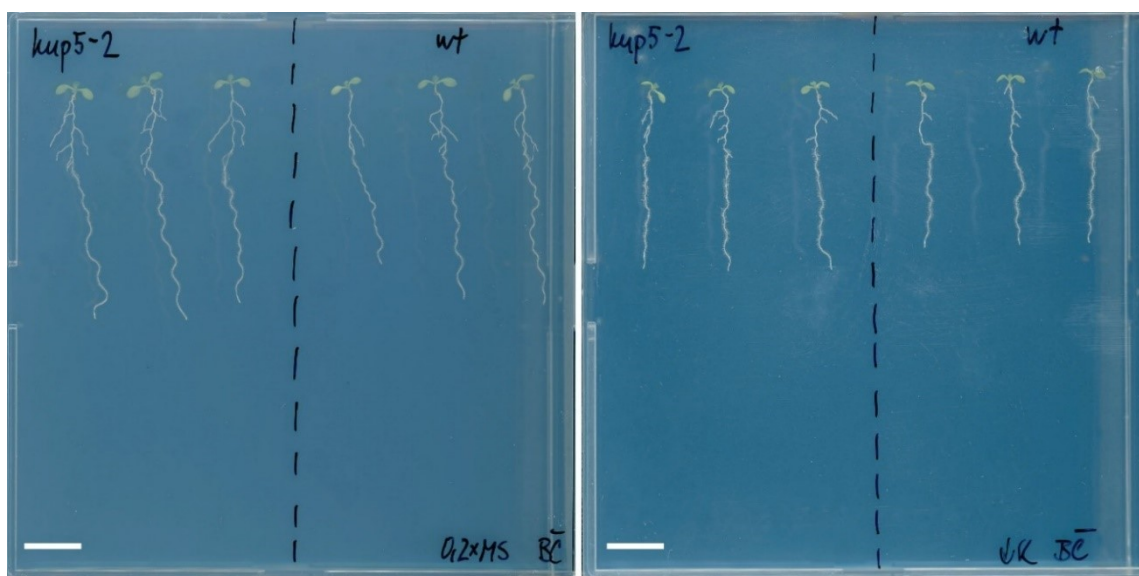
4.1 Analýza růstového fenotypu mutantu *kup5-2*

Pro ověření odlišného růstového fenotypu *kup5* mutantních rostlin (linie *kup5-1*; Štočková, 2020) byl hodnocen celkový růst kořenového systému a produkce biomasy u 2. linie *kup5* mutantních rostlin (linie *kup5-2*) v porovnání s rostlinami divokého typu.

Po úspěšném křížení homozygotních rostlin *kup5-2* (linie SALK_072850C) s rostlinami divokého typu (ekotyp Col-8, N60000) byly v F2 generaci vyselektovány homozygotní rostliny divokého typu (wt) a homozygotně mutantní rostliny (*kup5-2*) (viz 3.1 Rostlinný materiál a 3.2 Genotypování, křížení a selekce mutantu *kup5-2*). Tyto genotypy byly používány pro hodnocení růstového fenotypu v následujících experimentech.

4.1.1 Růst kořenového systému

Rostliny obou genotypů byly po dobu 5 dní pěstovány na 4 mM K⁺ médiu a poté byly na 2 dny přesazeny na dvě varianty média (4 mM K⁺ médium a 15 μM K⁺ médium). Pro analýzu kořenového systému byly skenovány sedmidenní rostliny, které jsou na obrázcích č. 14 a 15.

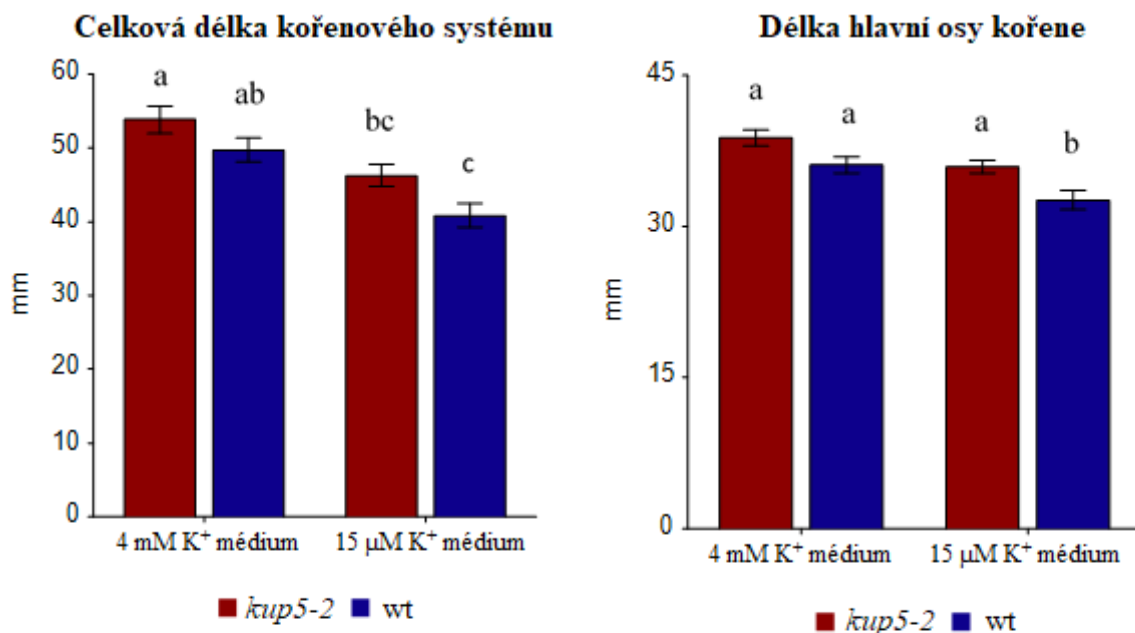


Obrázky č. 14 a 15: Rostliny mutantní (*kup5-2*, levá část misek) a divokého typu (wt, pravá část misek) kultivované *in vitro* pro analýzu kořenového systému. Varianta média - levá miska 4 mM K⁺ médium, pravá miska 15 μM K⁺ médium. Stáří rostlin - 7 dní (2 dny po přesazení na dvě varianty média). Měřítko – 1 cm.

U mutantních rostlin *kup5-2* byl pozorován celkově mírně větší kořenový systém oproti rostlinám divokého typu, což potvrzuje dříve pozorované odlišnosti v růstu kořenového systému u *kup5-1* mutantních rostlin (Štočková, 2020). Signifikantní rozdíly mezi genotypy byly zjištěny u celkové délky kořenového systému, délky hlavní osy kořene a počtu postranních kořenů 1. řádu (graf č. 1, 2, 4). Délka postranních kořenů se mezi genotypy nelišila, ale vykazovala podobný trend (graf č. 3).

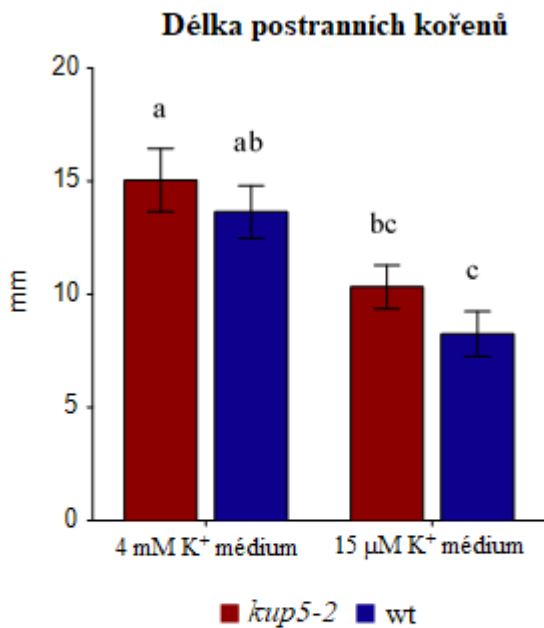
Na růst obou genotypů měla vliv varianta média, kdy na 15 μM K^+ médiu měly rostliny obou genotypů snížený růst kořenového systému oproti 4 mM K^+ médiu (grafy č. 1-4). Signifikantní rozdíly mezi variantami média byly zjištěny v celkové délce kořenového systému, v délce hlavní osy kořene a v délce postranních kořenů (graf č. 1, 2, 3). Mutantní rostliny však nevykazovaly odlišnou růstovou reakci na sníženou dostupnost K^+ v médiu ve srovnání s rostlinami divokého typu.

Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukázalo rozdíl v délce hlavní osy kořene ve variantě média 15 μM K^+ (graf č. 2) a v počtu postranních kořenů ve variantě 4 mM K^+ (graf č. 4). V ostatních parametrech kořenového systému má mutant *kup5-2* tendenci tvořit delší kořenový systém než rostlina divokého typu, rozdíl však v jednotlivých variantách média není signifikantní (grafy č. 1-4).

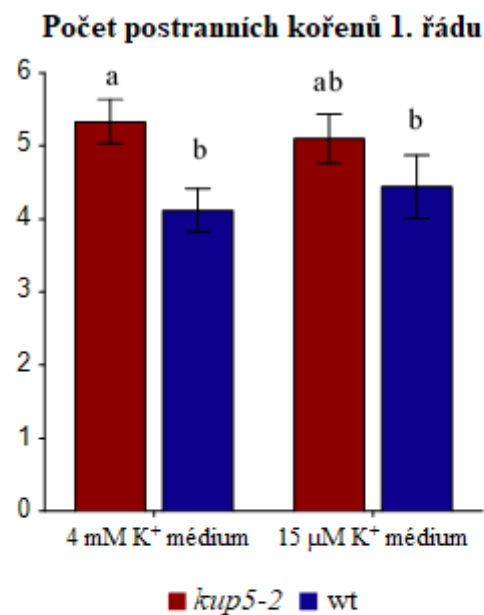


Graf č. 1: Celková délka kořenového systému; průměr \pm SE, $n = 25-30$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

Graf č. 2: Délka hlavní osy kořene; průměr \pm SE, $n = 25-30$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



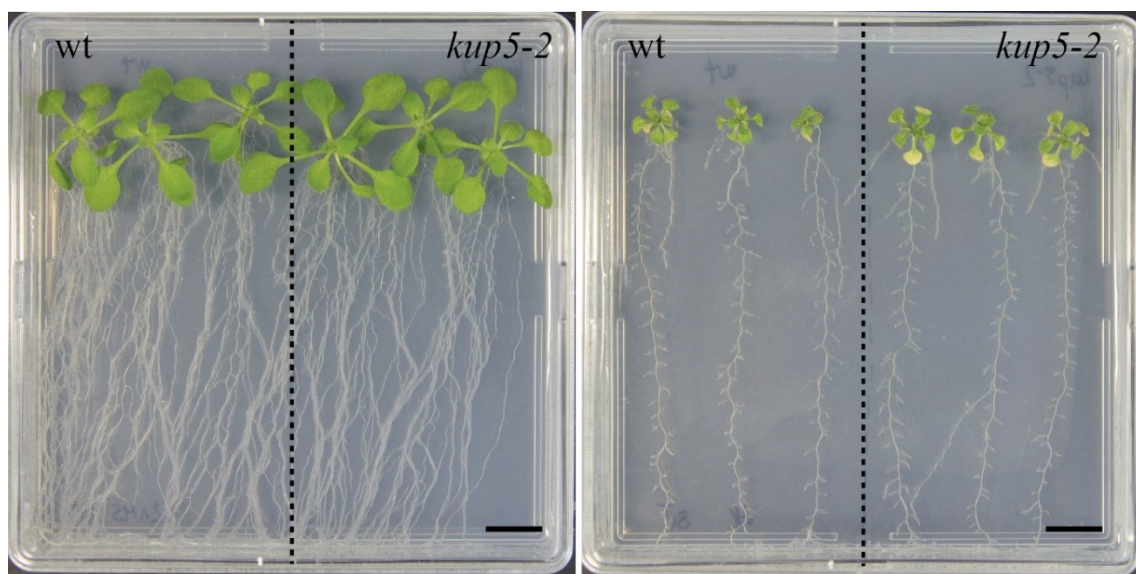
Graf č. 3: Délka postranních kořenů; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy p > 0,05 a variantami média p < 0,05 (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 4: Počet postranních kořenů 1. řádu; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy p < 0,05 a variantami média p > 0,05 (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

4.1.2 Produkce biomasy

Sedmidenní rostliny skenované pro analýzu kořenového systému (viz 4.1.1 Růst kořenového systému) byly ponechány v kultivační místnosti po dobu dalších 10 dní pro stanovení produkce biomasy prýtu a kořenů. Rostliny odebrané pro hodnocení produkce biomasy jsou na obrázcích č. 16 a 17.

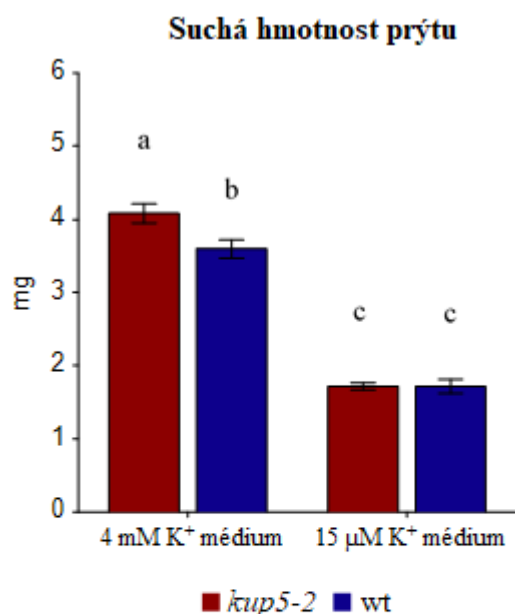


Obrázky č. 16 a 17: Rostliny mutantní (*kup5-2*, pravá část misek) a divokého typu (wt, levá část misek) kultivované *in vitro* pro stanovení produkce biomasy. Varianta média - levá miska 4 mM K⁺ médium, pravá miska 15 μM K⁺ médium. Stáří rostlin - 17 dní. Měřítko – 1 cm.

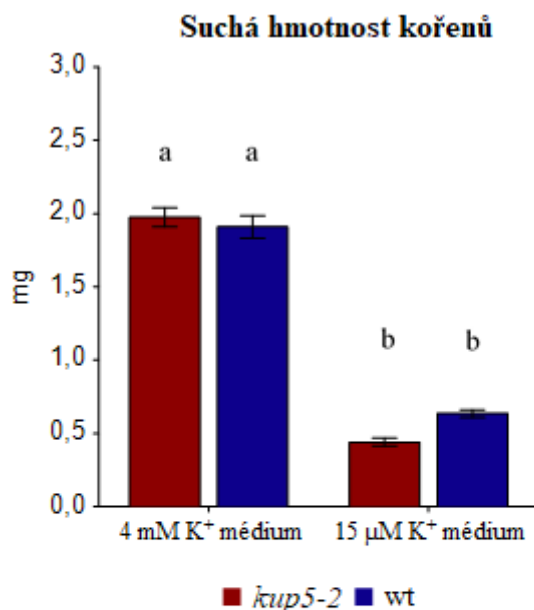
U mutantních rostlin *kup5-2* byla pozorována celkově vyšší produkce biomasy oproti rostlinám divokého typu, což opět potvrzuje dříve pozorované odlišnosti v produkci biomasy u *kup5-1* mutantních rostlin (Štočková, 2020). Signifikantní rozdíly mezi genotypy byly zjištěny u suché hmotnosti prýtu, relativního obsahu vody prýtu a relativního obsahu vody kořenů (grafy č. 5, 7, 8). Suchá hmotnost kořenů ve variantě média 4 mM K⁺ vykazovala podobný trend, rozdíl mezi genotypy však nebyl signifikantní. Ve variantě média 15 μM K⁺ vykazovala opačný trend, který ale souvisel spíše s chybovostí při vážení velmi nízkých hmotností kořenů než s vyšší hmotností kořenů rostlin divokého typu (graf č. 6).

Na produkci biomasy obou genotypů měla opět vliv varianta média, kdy na 15 μM K⁺ médiu měly rostliny obou genotypů nižší produkci biomasy a menší relativní obsah vody v biomase oproti 4 mM K⁺ médiu. Signifikantní rozdíly mezi variantami média byly pozorovány u všech měřených parametrů (grafy č. 5-8). Mutantní rostliny však nevykazovaly odlišnou růstovou reakci na sníženou dostupnost K⁺ v médiu ve srovnání s rostlinami divokého typu.

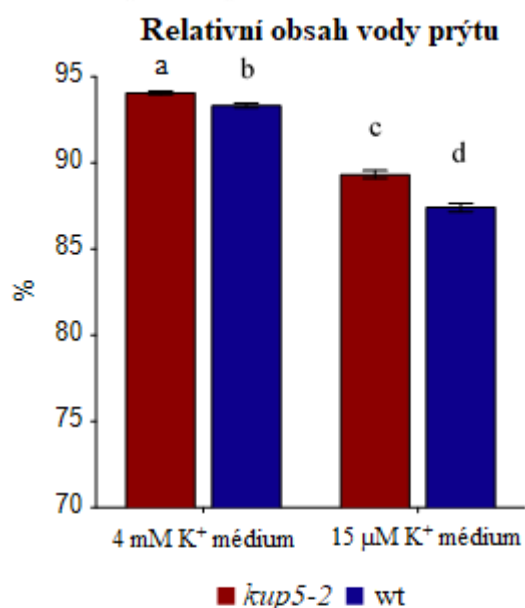
Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukázalo rozdíl v suché hmotnosti prýtu ve variantě média 4 mM K⁺ (graf č. 5), v relativním obsahu vody prýtu v obou variantách média (graf č. 7) a v relativním obsahu vody kořenů ve variantě média 15 μM K⁺ (graf č. 8).



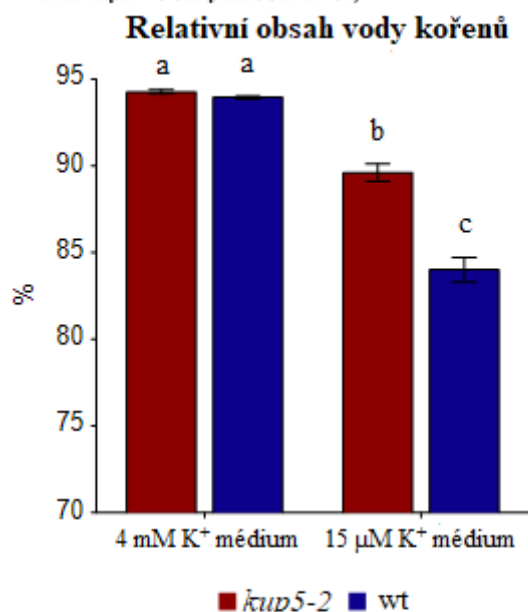
Graf č. 5: Suchá hmotnost prýtu; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 6: Suchá hmotnost kořenů; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami média $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 7: Relativní obsah vody prýtu; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

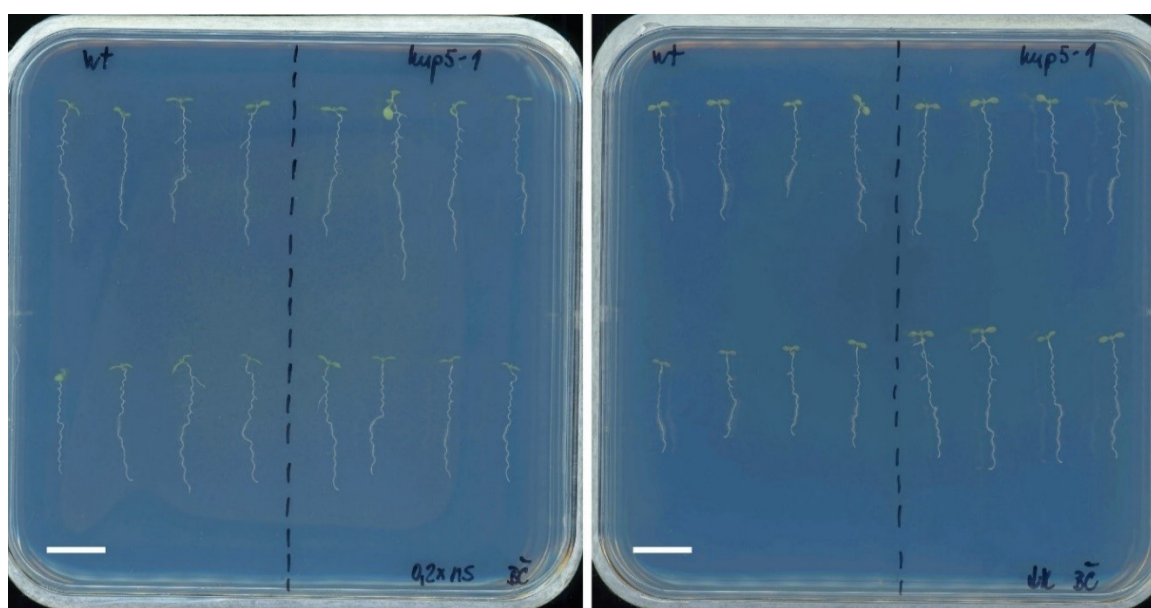


Graf č. 8: Relativní obsah vody kořenů; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

4.2 Detailní analýza růstového fenotypu mutantu *kup5-1*

Pro objasnění odlišného růstového fenotypu *kup5* mutantních rostlin byla provedena detailní analýza *kup5-1* mutantních rostlin. U rostlin byl hodnocen růst kořenového systému, velikost buněk primární kůry kořene, růst hypokotylu, velikost buněk hypokotylu a velikost meristematické zóny kořene.

Rostliny obou genotypů byly po dobu 5 dní pěstovány na 4 mM K⁺ médiu a poté byly na 2 dny přesazeny na dvě varianty média (4 mM K⁺ médium a 15 μM K⁺ médium). Pro hodnocení všech parametrů byly použity sedmidenní rostliny (obrázky č. 18 a 19).



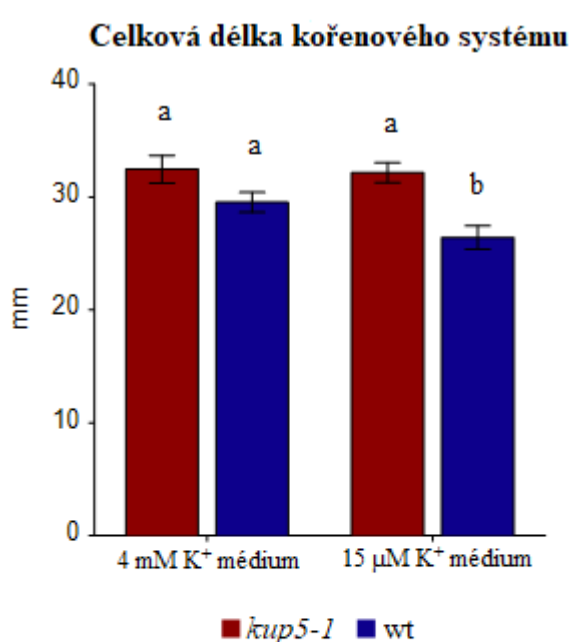
Obrázky č. 18 a 19: Rostliny mutantní (*kup5-2*, pravá část misek) a divokého typu (wt, levá část misek) kultivované *in vitro* pro analýzu kořenového systému. Varianta média - levá miska 4 mM K⁺ médium, pravá miska 15 μM K⁺ médium. Stáří rostlin - 7 dní (2 dny po přesazení na dvě varianty média). Měřítka – 1 cm.

4.2.1 Růst kořenového systému

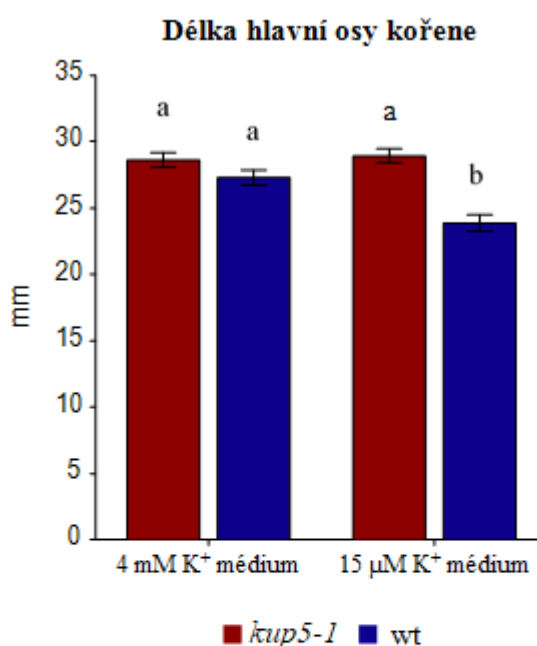
U mutantních rostlin *kup5-1* byl pozorován celkově mírně větší kořenový systém oproti rostlinám divokého typu, což potvrzuje již dříve pozorované odlišnosti v růstu kořenového systému (Štočková, 2020). Signifikantní rozdíly mezi genotypy byly zjištěny u celkové délky kořenového systému, délky hlavní osy kořene a počtu postranních kořenů 1. řádu (grafy č. 9, 10, 12). Délka postranních kořenů se mezi genotypy nelišila, ale na 15 μM K⁺ médiu vykazovala podobný trend (graf č. 11).

Signifikantní rozdíly mezi variantami média nebyly zjištěny u žádného z měřených parametrů. V této kultivaci ani jeden z genotypů nerostl ve variantě média 15 $\mu\text{M K}^+$ hůře než na variantě média 4 mM K^+ . Mutantní rostliny nevykazovaly odlišnou růstovou reakci na sníženou dostupnost K^+ v médiu ve srovnání s rostlinami divokého typu.

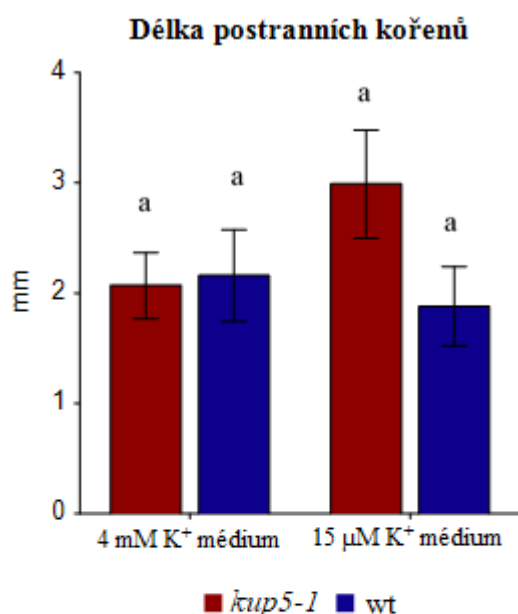
Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukázalo rozdíl v celkové délce kořenového systému ve variantě média 15 $\mu\text{M K}^+$ (graf č. 9) a v délce hlavní osy kořene ve variantě média 15 $\mu\text{M K}^+$ (graf č. 10). V ostatních parametrech kořenového systému má mutant *kup5-1* tendenci tvořit delší kořenový systém než rostlina divokého typu, rozdíl však v jednotlivých variantách média není signifikantní (grafy č. 9-12).



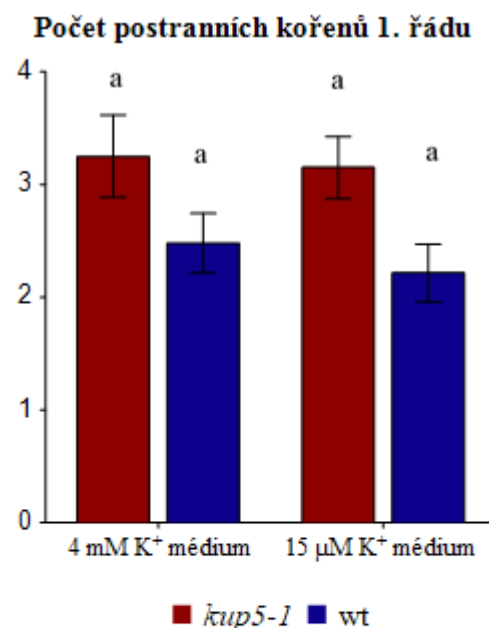
Graf č. 9: Celková délka kořenového systému; průměr \pm SE, $n = 25-30$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 10: Délka hlavní osy kořene; průměr \pm SE, $n = 25-30$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 11: Délka postranních kořenů; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy p > 0,05 a variantami média p > 0,05 (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

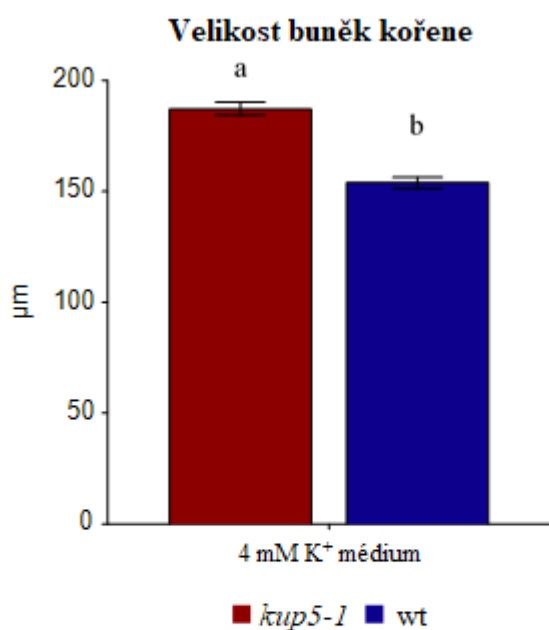


Graf č. 12: Počet postranních kořenů 1. řádu; průměr ± SE, n = 25-30. Rozdíly mezi genotypy p < 0,05 a variantami média p > 0,05 (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

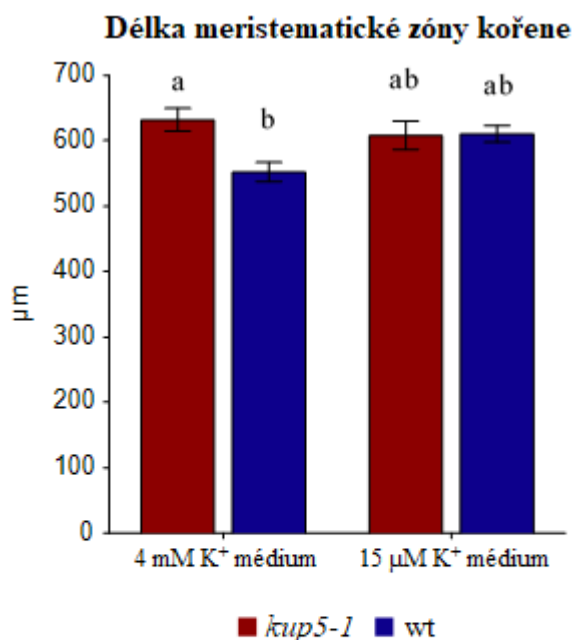
Velikost buněk kořene a velikost meristematické zóny kořene

Pro objasnění mechanismů, které způsobují větší růst kořenového systému *kup5* mutantních rostlin, byla měřena velikost buněk primární kůry kořenů a délka meristematické zóny kořene.

U mutantních rostlin *kup5-1* byla zjištěna celkově větší velikosti buněk primární kůry oproti rostlinám divokého typu. Byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi genotypy (graf č. 13). U mutantních rostlin *kup5-1* byly naměřeny i celkově mírně delší meristematické zóny kořenů oproti rostlinám divokého typu. Byl zde zjištěn signifikantní rozdíl mezi genotypy, rozdíl mezi variantami média však signifikantní nebyl (graf č. 14). Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukázalo rozdíl v délce meristematické zóny ve variantě média 4 mM K⁺ (graf č. 14). Ve variantě média 15 μM K⁺ nebyla patrná tendence mutanta *kup5-1* mít delší meristematickou zónu kořene (graf č. 14).



Graf č. 13: Velikost buněk kořene; průměr \pm SE, $n = 10$ (počet rostlin). Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 14: Délka meristematické zóny kořene; průměr \pm SE, $n = 10-15$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

4.2.2 Růst hypokotylů

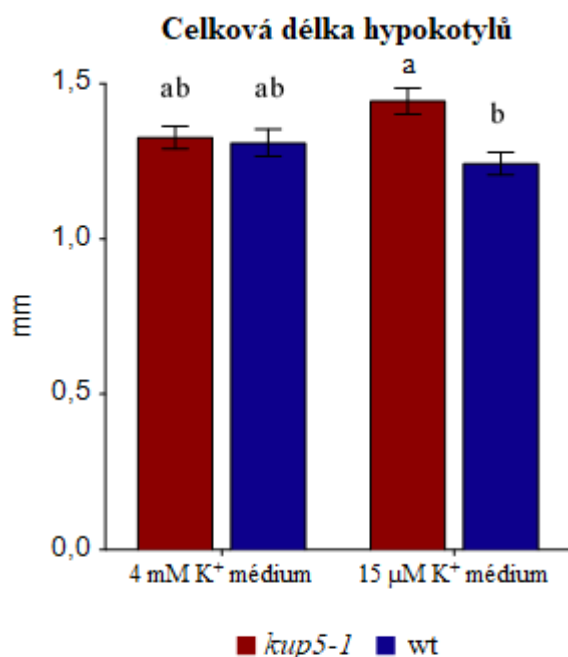
U mutantních rostlin *kup5-1* byla zjištěna celkově mírně větší délka hypokotylů oproti rostlinám divokého typu. U celkové délky hypokotylů byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi genotypy, nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl mezi variantami média (graf č. 15).

Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukázalo rozdíl v celkové délce hypokotylů ve variantě média 15 μM K⁺ (graf č. 15). Ve variantě média 4 mM K⁺ byla velmi málo patrná tendence mutanta *kup5-1* tvořit delší hypokotyl (graf č. 15).

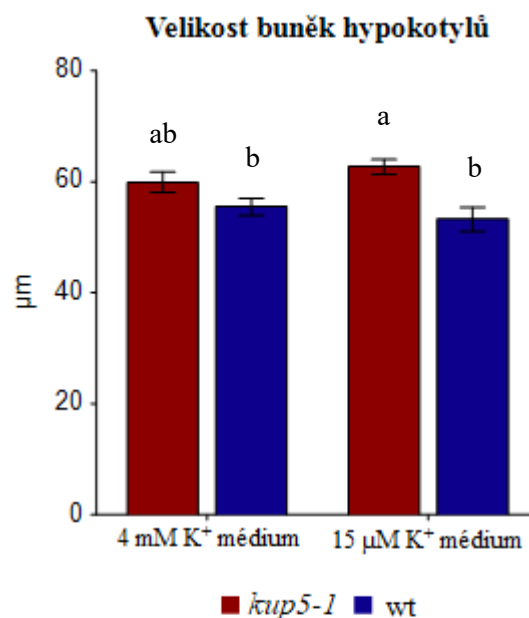
Velikost buněk hypokotylů

U mutantních rostlin *kup5-1* byla zjištěna celkově větší velikost buněk hypokotylů oproti rostlinám divokého typu. Byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi genotypy, nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl mezi variantami média (graf č. 16).

Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukázalo rozdíl ve velikosti buněk ve variantě média 15 μM K^+ (graf č. 16). Ve variantě média 4 mM K^+ byla patrná tendence mutanta *kup5-1* mít větší buňky hypokotylu, rozdíl však nebyl signifikantní (graf č. 16).



Graf č. 15: Celková délka hypokotylů; průměr \pm SE, $n = 10-15$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



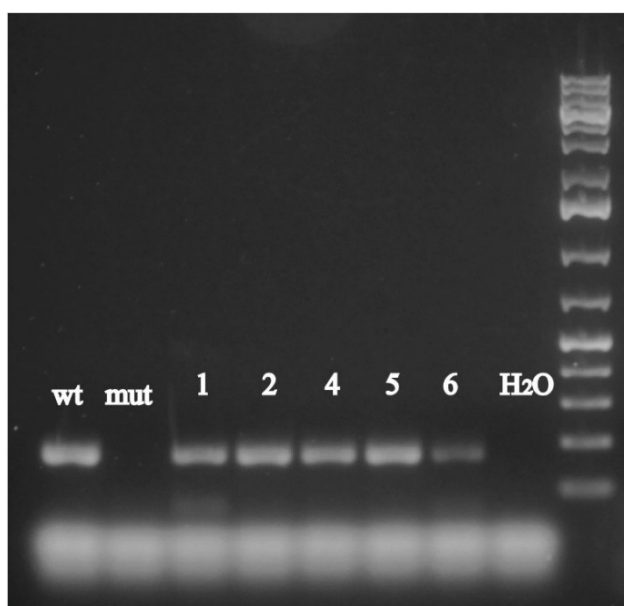
Graf č. 16: Velikost buněk hypokotylů; průměr \pm SE, $n = 10-15$ (počet rostlin). Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ a variantami média $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

4.3 Příprava linií *kup5* nesoucích konstrukt *pKUP5::KUP5:term* a *pKUP5::KUP5-GFP*

Podarilo se vytvořit konstrukt *pKUP5::KUP5:term*, který byl vložen společně s rezistencí pro herbicid BASTA do mutantního pozadí rostlin *kup5-1* a *kup5-2*. Postupně bylo vyselektováno několik nezávislých linií, u nichž byla pomocí genotypování ověřena přítomnost konstrukt *pKUP5::KUP5:term*. Následně byla izolována RNA, která byla v procesu reverzní transkripce převedena na cDNA. Ta byla použita pro semikvantitativní PCR, ve které byla potvrzena přítomnost transkriptu v jednotlivých liniích (obrázek č. 20). Dále byla provedena kvantitativní PCR, pomocí které měla být určena míra exprese genu

KUP5 v jednotlivých liniích. Kvantitativní PCR se kvůli problémům s použitými primery nezdařila. V rámci diplomové práce proto nebyl hodnocen růstový fenotyp těchto linií, jsou však připraveny pro další experimenty.

Dále byl již dříve vytvořený konstrukt *pKUP5::KUP5-GFP* (Štočková, 2020) vložen do mutantního pozadí rostlin *kup5-1* a *kup5-2*. Aktuálně probíhá selekce pozitivně transformovaných linií, z časových důvodů bohužel nebyla provedena analýza růstového fenotypu.



Obrázek č. 20: Potvrzení přítomnosti transkriptu genu *KUP5* v transformovaných rostlinách (konstrukt *pKUP5::KUP5:term* v mutantním pozadí *kup5-1*). Transkript byl detekován v rostlině divokého typu (wt), nebyl detekován v *kup5-1* mutantech (mut) a byl detekován v transformovaných liniích (1, 2, 4, 5, 6). Byla provedena negativní kontrola (H₂O). DNA žebříček - 1 kb marker (GeneRuler, ThermoScientific).

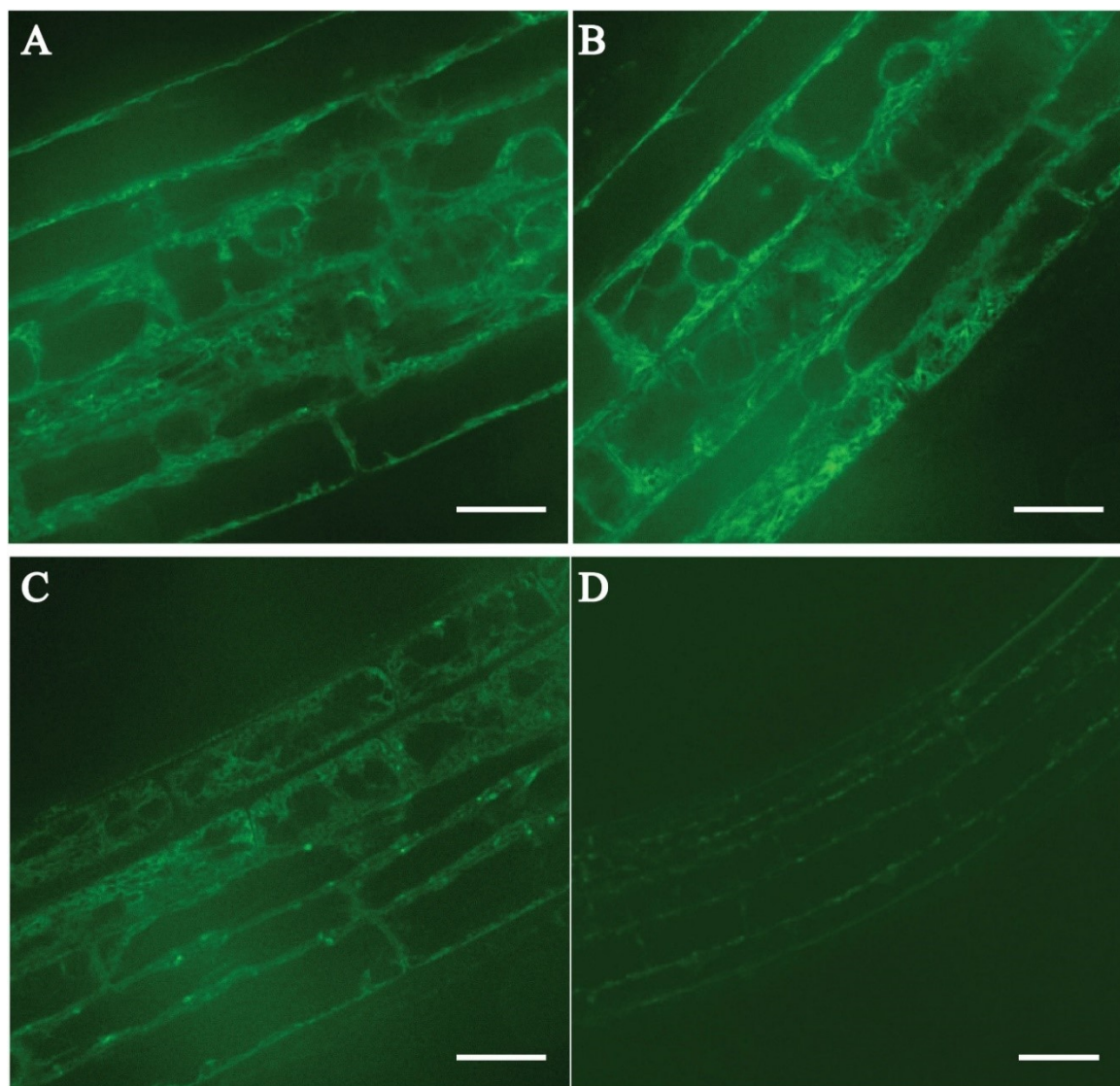
4.4 Lokalizace proteinu KUP5 v buňce pomocí translační fúze *pKUP5::KUP5-GFP*

Linie *A. thaliana* (Col-0) s konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP* byla vytvořena Mgr. Hanou Štočkovou, která pozorovala lokalizaci proteinu KUP5-GFP v ER (Štočková, 2020). Mým úkolem bylo zjistit, zda se lokalizace tohoto proteinu nemění při vystavení rostlin podmínkám nízké dostupnosti K⁺.

Výsledky pozorování potvrdily pravděpodobnou lokalizaci proteinu KUP5-GFP v ER v kontrolních podmínkách (Štočková, 2020). U rostlin bez vneseného konstruktu byl

pozorován pouze mírný autofluorescenční signál (obrázek č. 21 D), u transformovaných rostlin byl pozorován výrazný fluorescenční signál GFP v ER (obrázek č. 21 A, B, C).

U rostlin na 4 mM K⁺ médiu byl signál patrný v ER (obrázek č. 21 A). U rostlin přesazených na médium s nízkým obsahem K⁺ (15 μM K⁺ médium) nebyla zaznamenána změna lokalizace proteinu KUP5 v rámci buňky po 1 dnu (obrázek č. 21 B) ani po dvou dnech (obrázek č. 21 C).



Obrázek č. 21: Mikroskopické snímky lokalizace KUP5-GFP v kořenovém systému (za elongační zónou) rostlin *Arabidopsis* Col-0 v různých variantách média. Byl použit vertikální fluorescenční mikroskop CSU-W1 se softwarem VisiView 4.4.0.14, emise u GFP 520 nm. A, B, C - rostliny transformované konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP*, D - kontrolní rostlina *Arabidopsis* Col-0. A - 5 dní na 4 mM K⁺ médiu; B - 4 dny na 4 mM K⁺ médiu, 1 den na 15 μM K⁺ médiu; C - 4 dny na 4 mM K⁺ médiu, 2 dny na 15 μM K⁺ médiu. Měřítka: 20 μm (A, B, C), 50 μm (D).

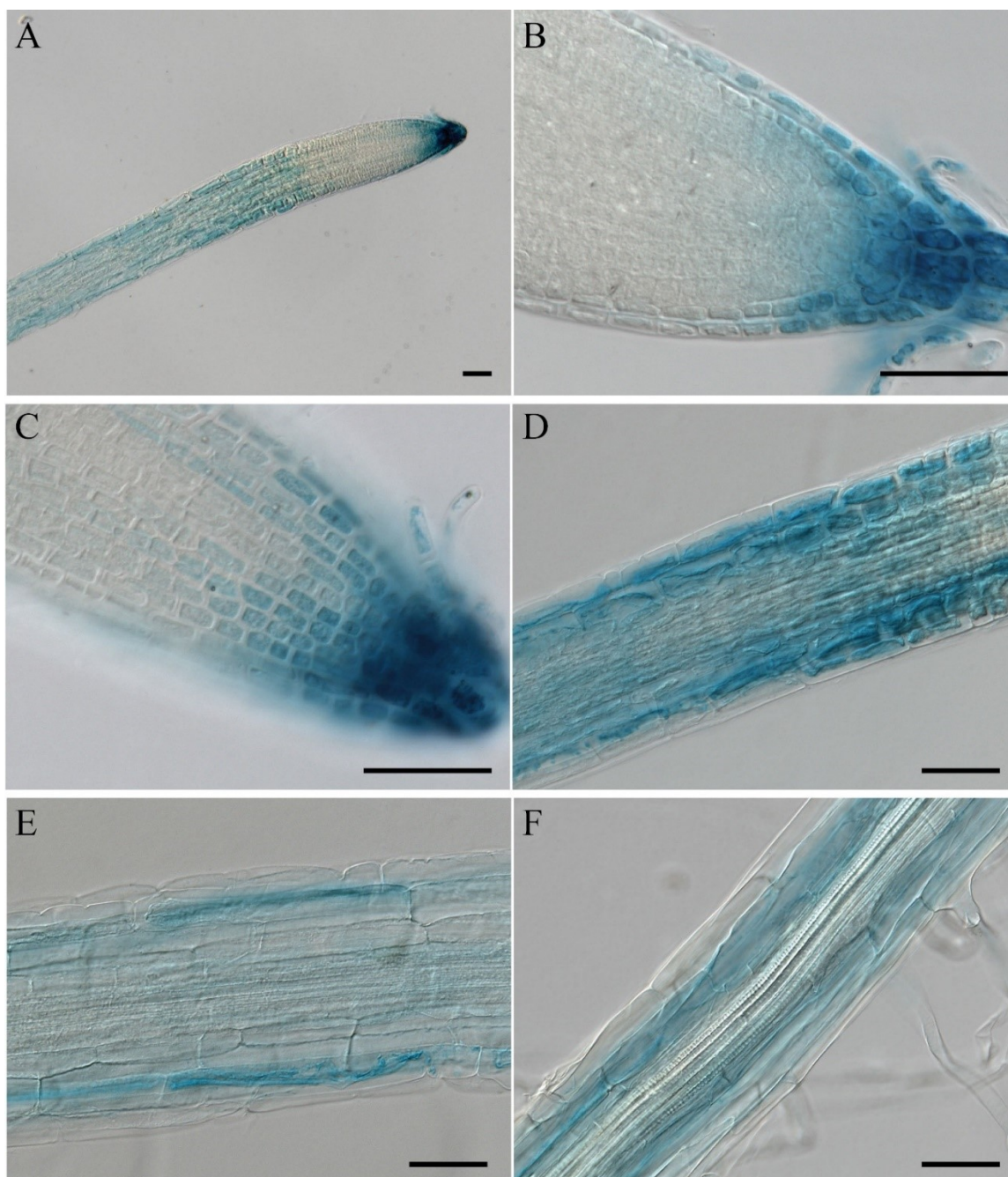
4.5 Lokalizace exprese genu *KUP5* v rostlině pomocí transkripční fúze *pKUP5:GUS*

Podařilo se vytvořit konstrukt *pKUP5:GUS*, který byl vložen společně s rezistencí pro herbicid BASTA do rostlin *A. thaliana* ekotypu Col-0. Následně bylo vyselektováno několik pozitivně transformovaných linií, u kterých byla úspěšně provedena detekce aktivity GUS.

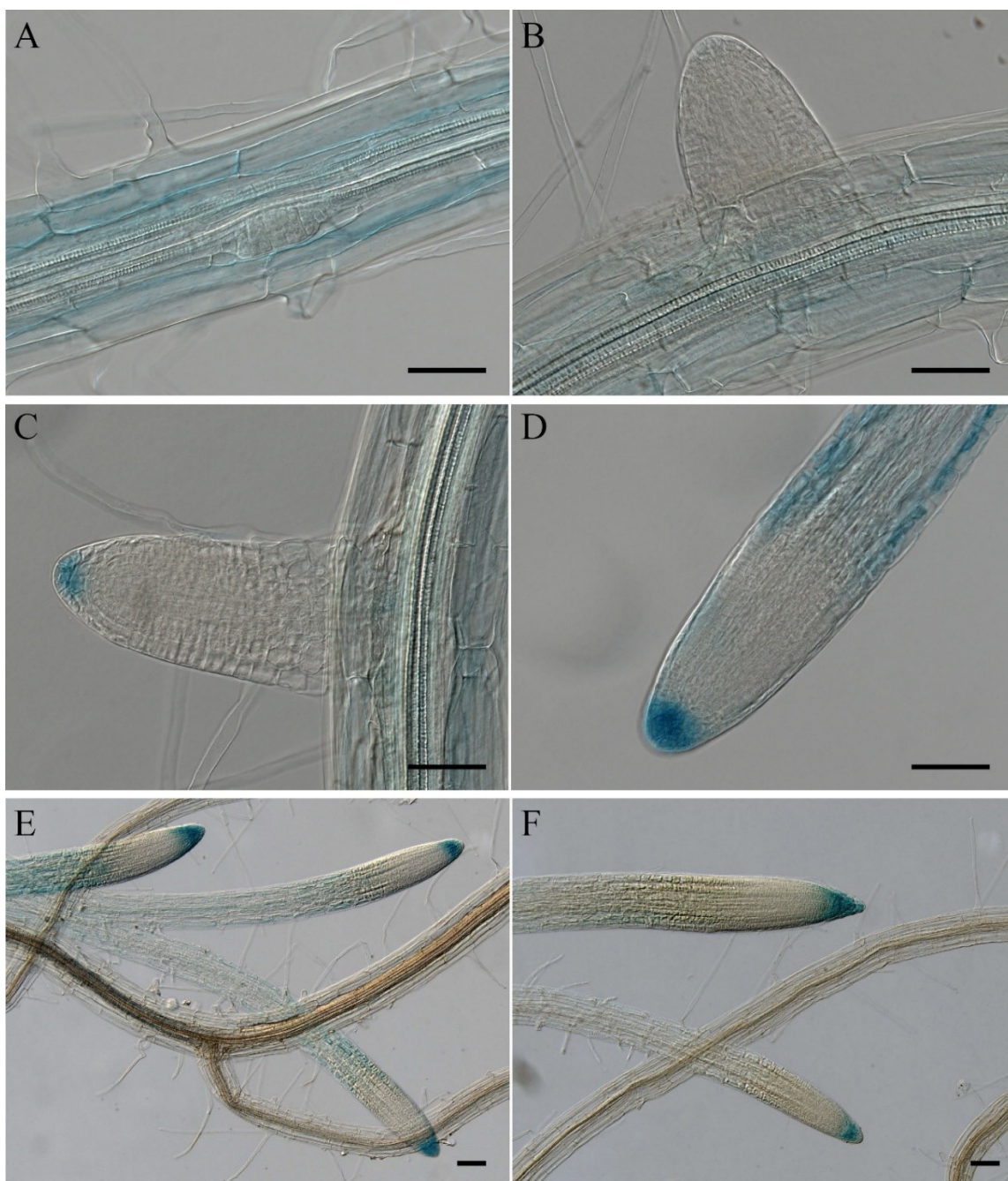
V kořenovém systému mladých rostlin (4 – 7 dní) byla aktivita GUS detekována v kořenové čepičce a elongační zóně hlavního kořene (obrázek č. 22 A, D). V meristematické zóně kořene a klidovém centru aktivita GUS nebyla detekována, pouze u silně se barvících rostlin byl modrý produkt vznikající při detekci aktivity GUS patrný i v klidovém centru meristému a jeho okolí. Po zaostření na povrch kořene a střední rovinu kořene je však pravděpodobné, že signál pocházel právě ze silně se barvící kořenové čepičky a aktivita GUS v klidovém centru přítomna nebyla (obrázek č. 22 B, C). Za elongační zónou hlavního kořene byla detekována aktivita GUS v pokožce kořene (obrázek č. 22 E). S posunem k bázi kořene se aktivita GUS přesunula z pokožky do primární kůry kořene (obrázek č. 22 F).

Postranní kořeny vykazovaly stejný trend jako hlavní kořen. Aktivita GUS v nich však byla patrná až v určité fázi vývoje. V primordiu postranního kořene nebyla detekována aktivita GUS (obrázek č. 23 A). Stejně tak nebyla detekována ve velmi krátkém a mladém postranním kořeni (obrázek č. 23 B). S postupným růstem a vývojem postranního kořene byla aktivita GUS detekována nejprve v kořenové čepičce (obrázek č. 23 C) a později i v elongační zóně kořene (obrázek č. 23 D). V kořenovém systému starších rostlin (10 – 14 dní) signál postupně slábnul a byl patrný pouze v kořenových čepičkách a elongačních zónách hlavního a postranních kořenů (obrázek č. 23 E, F).

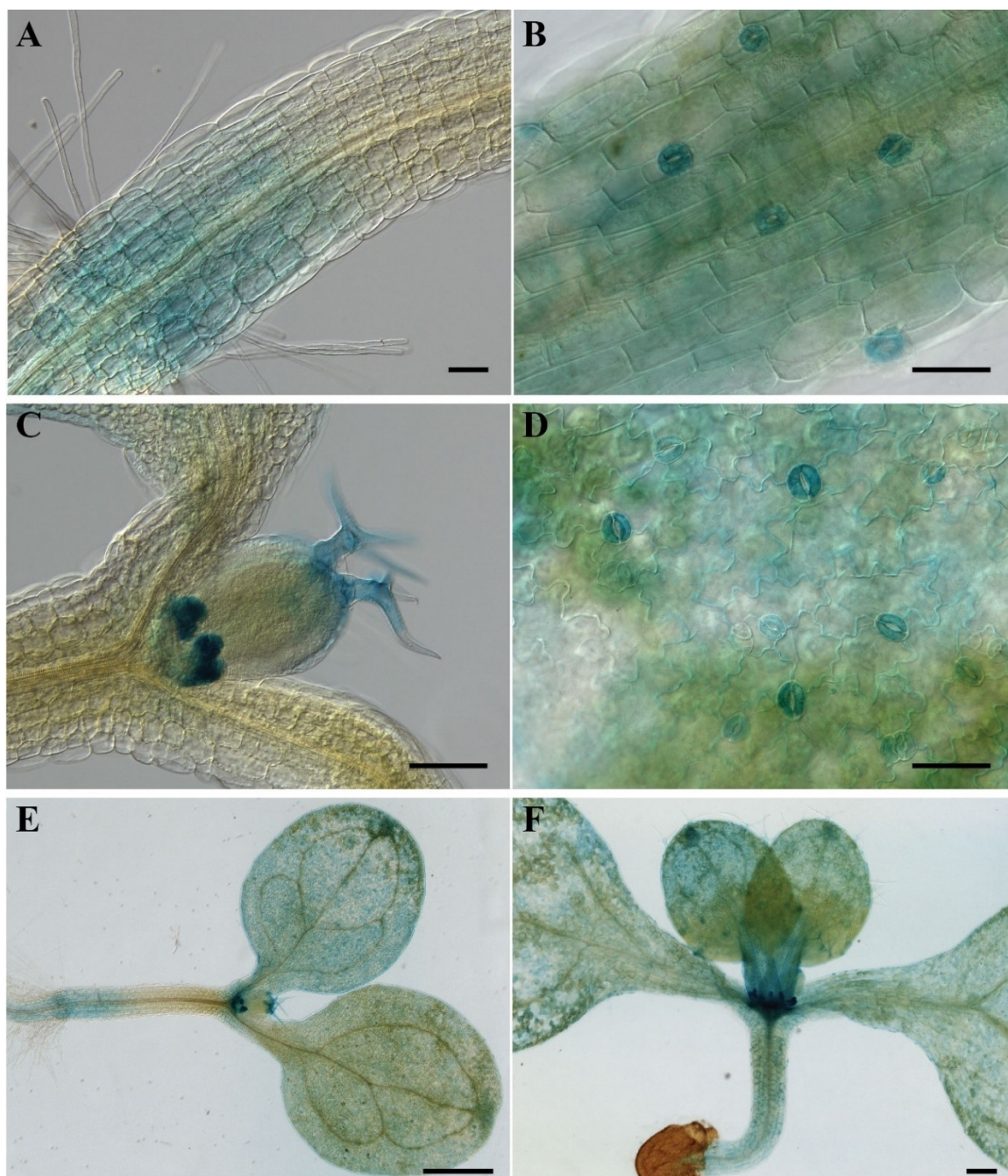
V nadzemní části byla u mladých rostlin (4 – 7 dní) aktivita GUS detekována v hypokotylu (obrázek č. 24 A), ve vyvíjejících se trichomech (obrázek č. 24 C) a ve svěracích buňkách průduchů (obrázek č. 24 B, D). O něco slabší aktivita pak byla detekována v pokožce vyvíjejících se děložních a prvních pravých listů a v řapících vyvíjejících se prvních pravých listů (obrázek č. 24 D, E, F). Ve starších rostlinách (10 – 14 dní) nebyla tato aktivita v prýtu detekována.



Obrázek č. 22: Detekce aktivity GUS v kořenovém systému rostlin *Arabidopsis* Col-0 transformovaných konstruktem *pKUP5:GUS*. A - hlavní kořen se zbarvenou kořenovou čepičkou a elongační zónou; B – hlavní kořen se zaostřením na střední rovinu - barvící se kořenová čepička, nebarvící se meristém a klidové centrum; C – hlavní kořen se zaostřením na jeho povrch - barvící se kořenová čepička; D - elongační zóna hlavního kořene; E – zóna hlavního kořene za elongační zónou se zbarvenou pokožkou; F – báze hlavního kořene se zbarvenou primární kůrou. Stáří rostlin - 4 – 7 dní. Měřítka - 50 μ m.



Obrázek č. 23: Detekce aktivity GUS v kořenovém systému rostlin *Arabidopsis* Col-0 transformovaných konstruktem *pKUP5:GUS*. A - hlavní kořen se zbarvenou primární kůrou, primordium postranního kořene bez detekce aktivity GUS; B - mladý postranní kořen bez detekce aktivity GUS; C - vývojově starší postranní kořen (v porovnání s B) s již zbarvenou kořenovou špičkou; D - postranní kořen se zbarvenou špičkou a elongační zónou kořene; E - zbarvené kořenové špičky a elongační zóny kořenů; F - zbarvené kořenového špičky. Stáří rostlin - 4 – 7 dní (A, B, C, D); 10 – 14 dní (E, F). Měřítka - 50 μm .



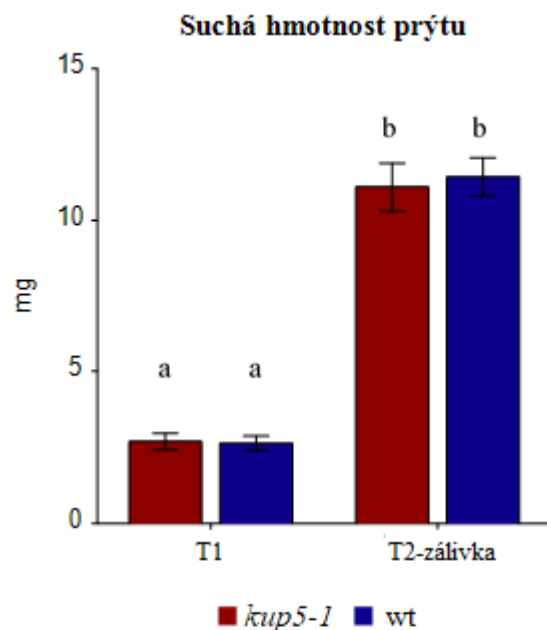
Obrázek č. 24: Detekce aktivity GUS rostlin *Arabidopsis* Col-0 transformovaných konstruktem *pKUP5:GUS*. A - zbarvená báze hypokotylu; B - zbarvené průduchy v pokožce hypokotylu; C - zbarvené vyvíjející se trichomy prvních pravých listů; D - zbarvené průduchy v listové pokožce; E - pohled na prýt čtyřdenní rostliny; F - pohled na prýt sedmidenní rostliny. Stáří rostlin - 4 - 7 dní. Měřítka - 50 μm (A, B, C, D) a 200 μm (E, F).

4.6 Odolnost mutantů *kup5* vůči suchu

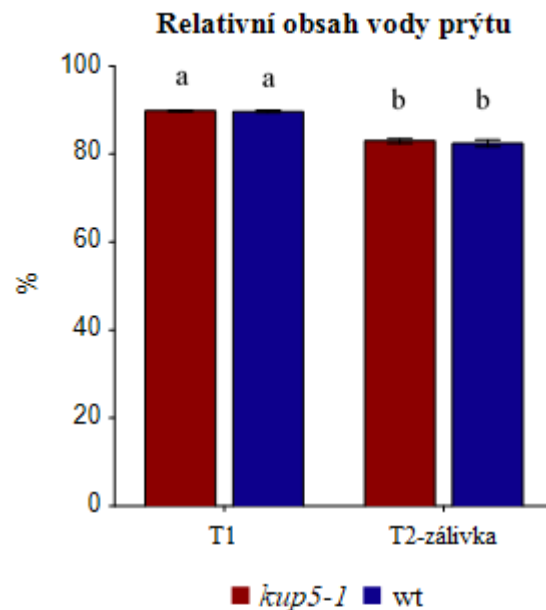
V této části práce bylo testováno možné zapojení transportéru KUP5 do regulace výdeje vody rostlinou. Mutantní rostliny *kup5-1* byly kultivovány v substrátu po dobu cca 4 týdnů, z toho byly na 7-10 dní vystaveny působení sucha.

1. experiment

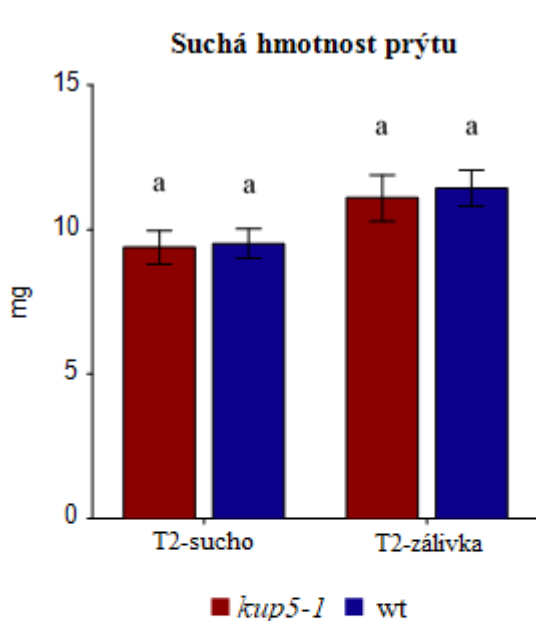
Mutantní rostliny *kup5-1* se nelišily v odolnosti vůči suchu a hospodaření s vodou oproti rostlinám divokého typu, respektive se nelišily v suché hmotnosti prýtu ani relativním obsahu vody v prýtech. Při plné záливce nebyly rozdíly mezi genotypy pozorovány ani u mladších rostlin při 1. odběru (varianta T1; 3 týdny kultivace při plné záливce; grafy č. 17 a 18), ani u starších rostlin při 2. odběru (varianta T2-záливka; 4 týdny kultivace při plné záливce; grafy č. 17 a 18). Genotypy se nelišily ani po vystavení periodě sucha (varianta T2-sucho; 3 týdny kultivace při plné záливce + 1 týden kultivace zcela bez záливky; grafy č. 19 a 20). V *ex vitro* podmínkách nebyli mutanti *kup5-1* většího vzrůstu oproti rostlinám divokého typu (grafy č. 17 a 19) jako tomu bylo v *in vitro* podmínkách. Byly zjištěny pouze signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace, a to v obou sledovaných parametrech (grafy č. 17-20). Detailní srovnání variant kultivace ukázalo rozdíl v suché hmotnosti prýtu i relativním obsahu vody prýtu mezi variantou T1 a T2-záливka. Starší rostliny byly větší, ale měly menší relativní obsah vody v prýtech, což značí ontogenetický vývoj rostlin v rámci času (grafy č. 17 a 18). Dále byl zjištěn rozdíl v relativním obsahu vody prýtu mezi variantou T2-záливka a T2-sucho, který vyplývá z nedostupnosti/dostupnosti vody (graf č. 20). U suché hmotnosti prýtu byla patrná tendence rostlin varianty T2-záливka mít vyšší suchou hmotnost, rozdíl oproti variantě T2-sucho však nebyl signifikantní (graf č. 19).



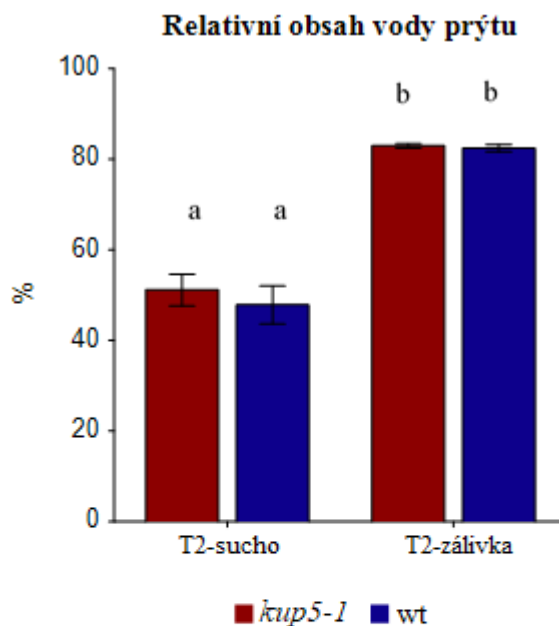
Graf č. 17: Suchá hmotnost prýtu; průměr ± SE, n = 25-30. T1 - 1. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 18: Relativní obsah vody prýtu; průměr ± SE, n = 25-30. T1 - 1. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 19: Suchá hmotnost prýtu; průměr \pm SE, $n = 25-30$. T2-sucho - 2. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden bez zálivky; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

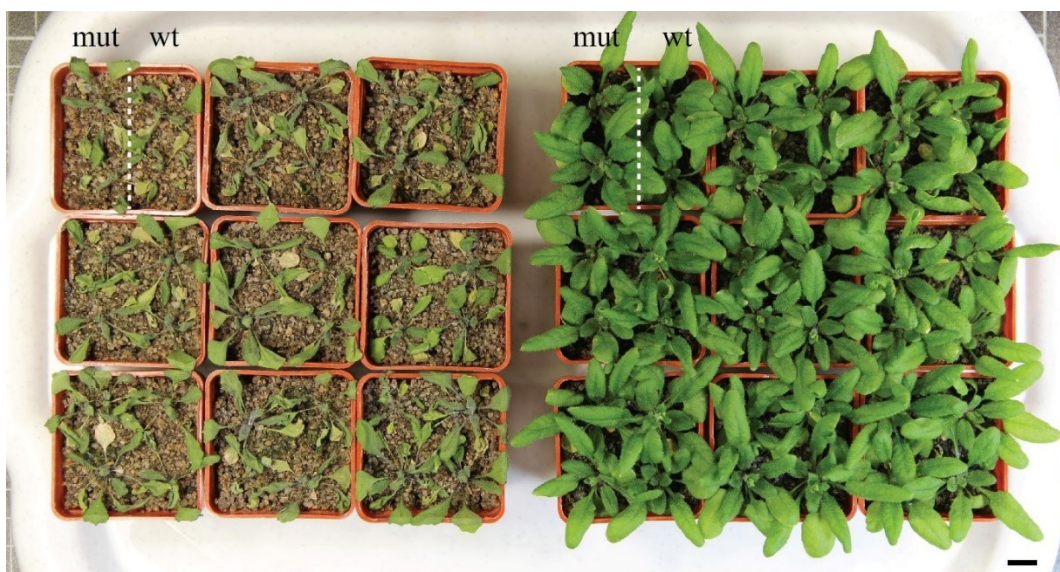


Graf č. 20: Relativní obsah vody prýtu; průměr \pm SE, $n = 25-30$. T2-sucho - 2. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden bez zálivky; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

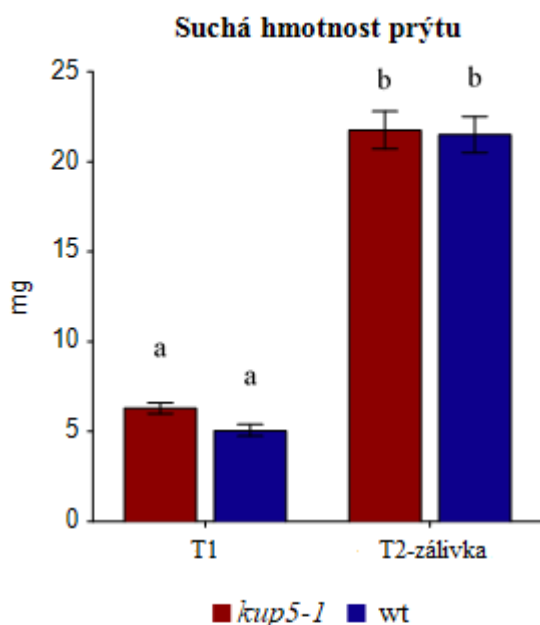
2. experiment

Kvůli nerovnoměrnému vysychání květináčů v 1. experimentu byl experiment zopakován (viz Metodika). Výsledky 2. experimentu potvrdily výsledky 1. experimentu. Mutantní rostliny *kup5-1* se nelišily v odolnosti vůči suchu a hospodaření s vodou oproti rostlinám divokého typu. Nelišily se v relativním obsahu vody (grafy č. 22 a 24) a nebyly v *ex vitro* podmínkách většího vzrůstu oproti rostlinám divokého typu (grafy č. 21 a 23). Podobně jako v 1. experimentu, signifikantní rozdíly mezi genotypy nebyly zjištěny v žádném z měřených parametrů, byly ale zjištěny signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace ve všech parametrech (grafy č. 21-24). Detailní srovnání variant kultivace ukázalo navíc signifikantní rozdíl v suché hmotnosti prýtu mezi variantou T2-zálivka a T2-sucho oproti 1. experimentu (graf č. 23).

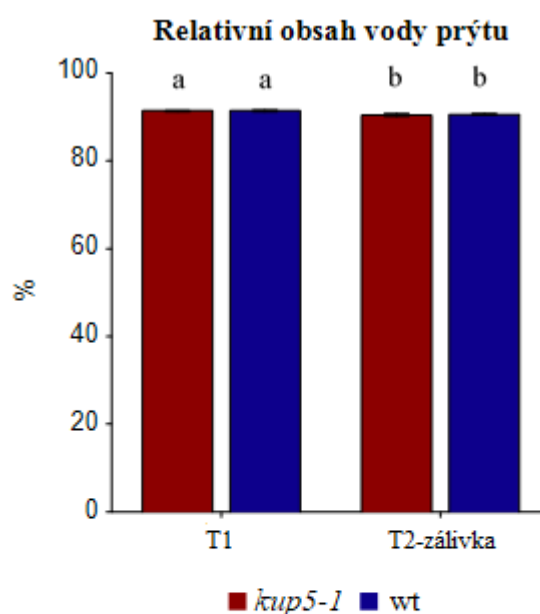
Výsledky byly jinak totožné s 1. experimentem. Rostliny variant T2-sucho a T2-zálivka jsou na obrázku č. 25.



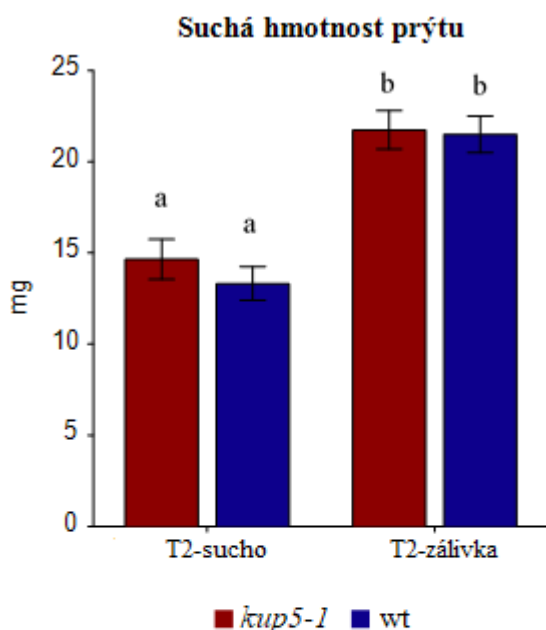
Obrázek č. 25: Experiment odolnosti mutantních rostlin *kup5-1* vůči suchu. V levé části obrázku jsou rostliny vystavené suchu (varianta T2-sucho), v pravé části obrázku jsou zalévané rostliny (varianta T2-zálivka). V levé části květináčů jsou 2 mutantní rostliny *kup5-1* (mut), v pravé části květináčů jsou 2 rostliny divokého typu (wt). Měřítko - 1 cm



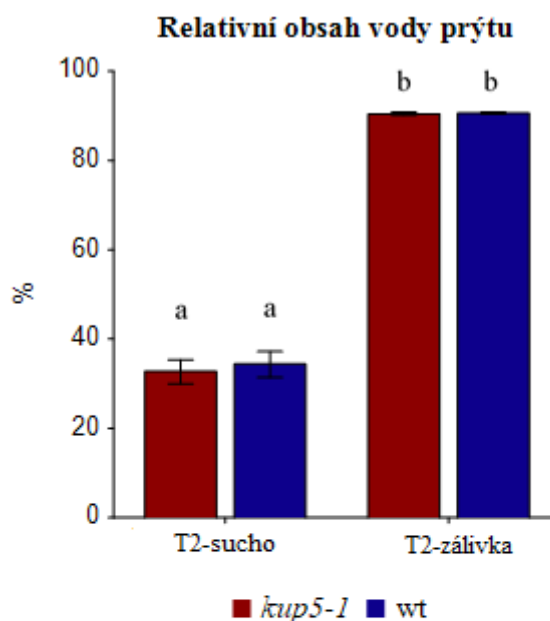
Graf č. 21: Suchá hmotnost prýtu; průměr \pm SE, $n = 25-30$. T1 - 1. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 22: Relativní obsah vody prýtu; průměr \pm SE, $n = 25-30$. T1 - 1. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 23: Suchá hmotnost prýtu; průměr \pm SE, $n = 25-30$. T2-sucho - 2. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden bez zálivky; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 24: Relativní obsah vody prýtu; průměr \pm SE, $n = 25-30$. T2-sucho - 2. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden bez zálivky; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

4.7 Reakce mutantů *kup9* na různé podmínky prostředí

Tato část práce byla zaměřena na rostliny mutantní v transportéru KUP9. Všechny tyto experimenty jsem prováděla ve spolupráci s Mgr. Markem Šustrem v návaznosti na jeho aktuálně řešenou disertační práci.

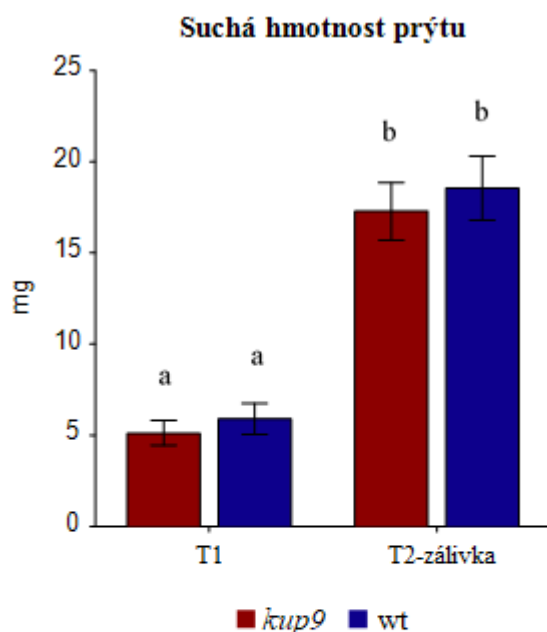
4.7.1 Odolnost mutantů *kup9* vůči suchu

V tomto experimentu bylo testováno možné zapojení transportéru KUP9 do regulace výdeje vody rostlinou. Mutantní rostliny *kup9* byly kultivovány v substrátu po dobu cca 4 týdnů, z toho byly na 7-10 dní vystaveny působení sucha.

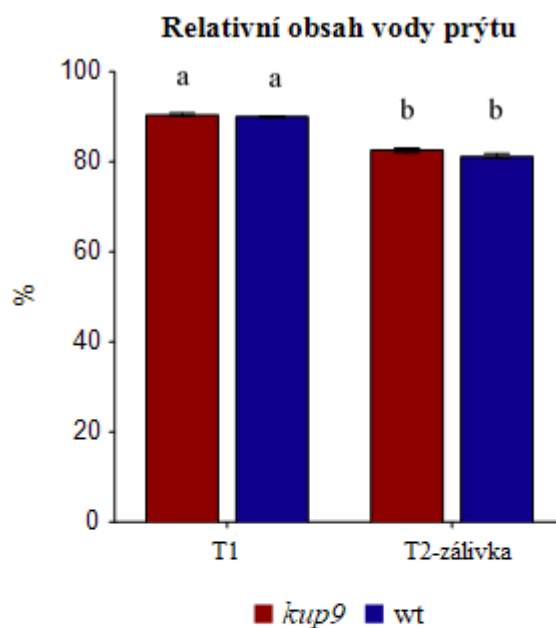
Mutantní rostliny *kup9* se nelišily v odolnosti vůči suchu oproti rostlinám divokého typu. Genotypy se nelišily v suché hmotnosti prýtu ani relativním obsahu vody. Při plné zálivce

nebyly rozdíly mezi genotypy pozorovány ani u mladších rostlin při 1. odběru (varianta T1; 3 týdny kultivace při plné zálivce), ani u starších rostlin při 2. odběru (varianta T2-zálivka; 4 týdny kultivace při plné zálivce; grafy č. 25 a 26). Genotypy se nelišily ani po vystavení periodě sucha (varianta T2-sucho; 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden kultivace zcela bez zálivky; grafy č. 27 a 28). Byla zde patrná tendence mutantů *kup9* mít menší suchou hmotnost prýtu oproti rostlinám divokého typu, rozdíl však nebyl signifikantní (grafy č. 25 a 27).

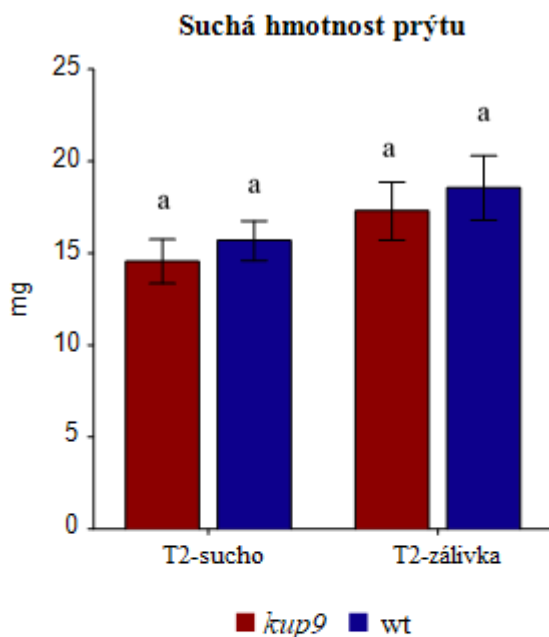
Byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace u suché hmotnosti prýtu a relativního obsahu vody prýtu ve variantě T1 a T2-zálivka (grafy č. 25 a 26) a relativního obsahu vody prýtu ve variantě T2-sucho a T2-zálivka (graf č. 28). Detailní srovnání variant kultivace ukázalo rozdíl v suché hmotnosti prýtu i relativním obsahu vody prýtu mezi T1 a T2-zálivka variantou. Starší rostliny byly větší, ale měly menší relativní obsah vody v prýtech, což značí ontogenetický vývoj rostlin v rámci času (grafy č. 25 a 26). Mezi variantami T2-sucho a T2-zálivka nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v suché hmotnosti prýtu ani v relativním obsahu vody prýtu. Byla však patrná mírná tendence rostlin varianty T2-zálivka mít vyšší suchou hmotnost prýtu i relativní obsah vody prýtu oproti rostlinám varianty T2-sucho, rozdíl však nebyl signifikantní (grafy č. 27 a 28).



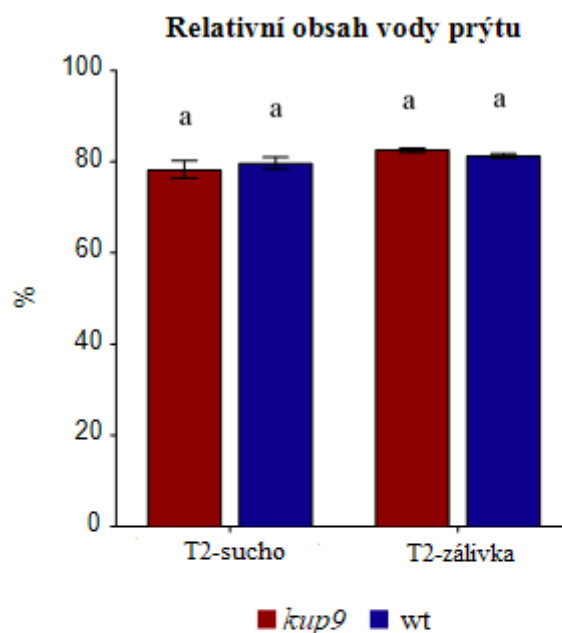
Graf č. 25: Suchá hmotnost prýtu; průměr \pm SE, $n = 15-20$. T1 - 1. odběr, 3 týdny kultivace při plné záливce; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné záливce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 26: Relativní obsah vody prýtu; průměr \pm SE, $n = 15-20$. T1 - 1. odběr, 3 týdny kultivace při plné záливce; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné záливce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 27: Suchá hmotnost prýtu; průměr \pm SE, $n = 15-20$. T2-sucho - 2. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden bez zálivky; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 28: Relativní obsah vody prýtu; průměr \pm SE, $n = 15-20$. T2-sucho - 2. odběr, 3 týdny kultivace při plné zálivce + 1 týden bez zálivky; T2-zálivka - 2. odběr, 4 týdny kultivace při plné zálivce. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ a variantami kultivace $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi všemi variantami (Bonferroni Multiple Comparison Test).

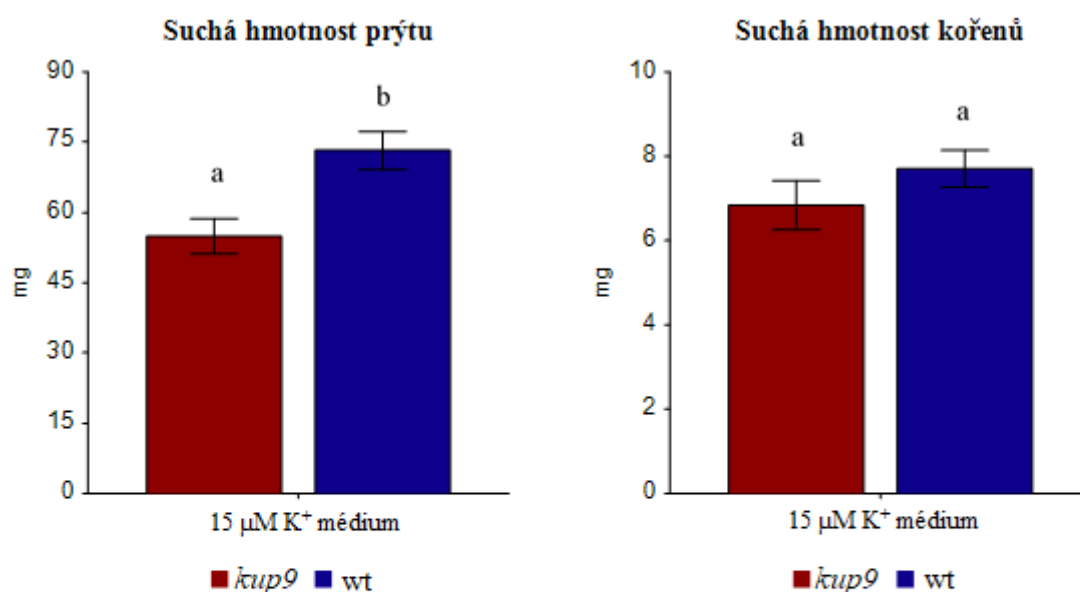
4.7.2 Reakce mutantů *kup9* na různou fotoperiodu a ozáření

V těchto experimentech bylo testováno možné zapojení transportéru KUP9 v translokaci K^+ floémem, respektive jeho možná role v efektivitě floémového toku. Mutantní rostliny *kup9* byly vystaveny podmínkám různé fotoperiody a různé ozáření za účelem ovlivnit produkci asimilátů v listech. Cílem bylo zjistit, zda taková změna podmínek ovlivní celkový růstový fenotyp *kup9* rostlin.

Rostliny byly kultivovány v hydroponii po dobu cca 6 týdnů (viz uspořádání jednotlivých experimentů v Metodice) a vystaveny fotoperiodě dlouhého dne (16 hod světlo, 8 hod tma; 1. experiment), krátkého dne (8 hod světlo, 16 hod tma; 2. experiment), nízké ozáření (PAR=65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 3. experiment), nízké ozáření (PAR=40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 4. experiment) a vysoké ozáření (PAR=270-500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 5. experiment).

1. experiment

Mutantní rostliny *kup9* měly za podmínek fotoperiody dlouhého dne a standardní ozáření (PAR=110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) celkově zhoršený růst oproti rostlinám divokého typu. Mutantní rostliny *kup9* měly signifikantně menší suchou hmotnost prýtu oproti rostlinám divokého typu, rozdíl činil 15% (graf č. 29). Nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl v suché hmotnosti kořenů oproti rostlinám divokého typu, rozdíl činil 6% (graf č. 30). Mutantní rostliny *kup9* měly tendenci mít menší suchou hmotnost kořenů, rozdíl však nebyl signifikantní (graf č. 30).

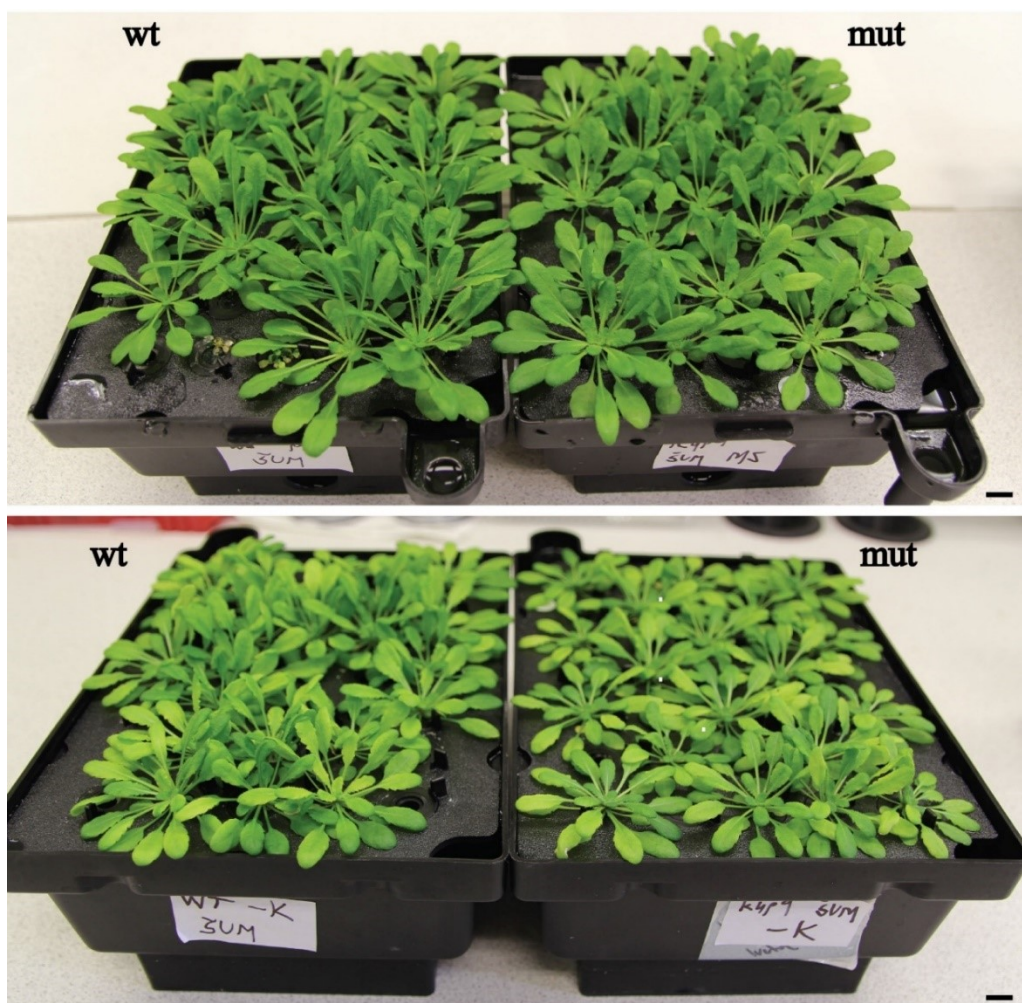


Graf č. 29: Suchá hmotnost prýtu, průměr \pm SE, $n = 15-20$. Fotoperioda = 16 hod světlo, 8 hod tma. Ozáření = 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).

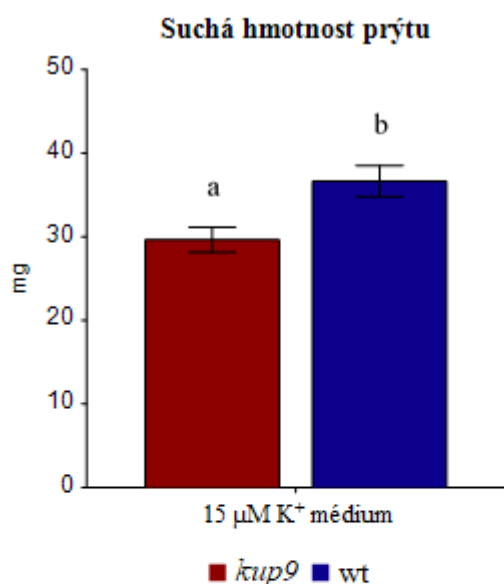
Graf č. 30: Suchá hmotnost kořenů, průměr \pm SE, $n = 15-20$. Fotoperioda = 16 hod světlo, 8 hod tma. Ozáření = 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).

2. experiment

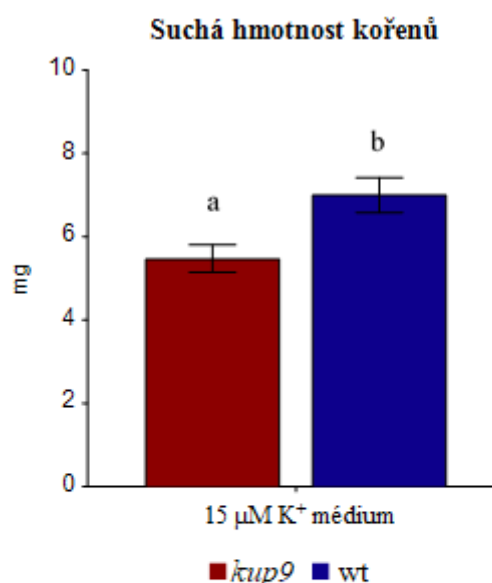
Mutantní rostliny *kup9* měly za podmínek fotoperiody krátkého dne a standardní ozáření (PAR=110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) celkově zhoršený růst oproti rostlinám divokého typu (obrázek č. 26). Mutantní rostliny *kup9* měly signifikantně menší suchou hmotnost prýtu oproti rostlinám divokého typu, rozdíl činil 11% (graf č. 31). Byl zjištěn také signifikantní rozdíl v suché hmotnosti kořenů. Mutantní rostliny *kup9* měly signifikantně menší suchou hmotnost kořenů oproti rostlinám divokého typu, rozdíl činil 13% (graf č. 32).



Obrázek č. 26: Experiment s reakcí mutantních rostlin *kup9* na fotoperiodu krátkého dne. V horní polovině obrázku jsou rostliny pěstované na 4 mM K⁺ médiu, ve spodní polovině obrázku jsou rostliny pěstované na 15 μM K⁺ médiu. Vlevo rostliny divokého typu (wt), vpravo mutantní rostliny *kup9* (mut). Ozáření a fotoperioda = 110 μmol/m²/s a 8 hod světlo, 16 hod po celou dobu kultivace. Měřítka - 1 cm.



Graf č. 31: Suchá hmotnost prýtu, průměr ± SE, n = 15-20. Fotoperioda = 8 hod světlo, 16 hod tma. Ozáření = 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 32: Suchá hmotnost kořenů, průměr ± SE, n = 15-20. Fotoperioda = 8 hod světlo, 16 hod tma. Ozáření = 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rozdíly mezi genotypy $p < 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).

3. experiment

Jak již bylo zmíněno v metodice (viz 3.4.4 Hydroponická kultivace), 3. experiment nebyl úspěšný a z důvodu nízkého počtu rostlin vhodných pro hodnocení nebyl statisticky vyhodnocen. Experiment byl tedy zopakován v mírně pozměněném uspořádání.

4. experiment

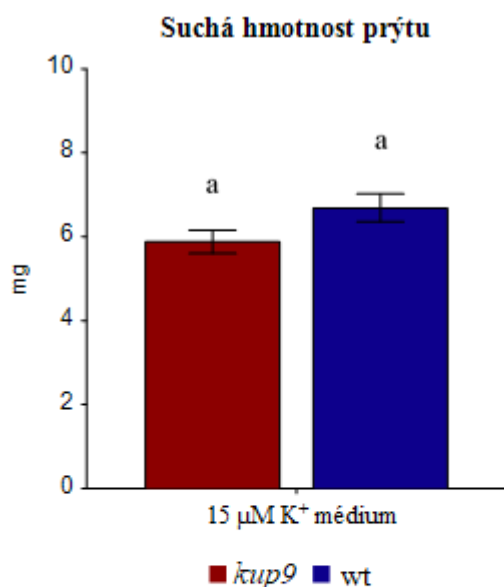
V tomto experimentu byly rostliny 14 dní pěstovány na standardní ozáření (PAR=110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) v podmínkách krátkého dne a následně jim byla na 4 týdny snížena ozáření na 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (viz 3.4.4 Hydroponická kultivace, 4. experiment).

Mutantní rostliny *kup9* se za těchto podmínek nelišily v růstu oproti rostlinám divokého typu (obrázek č. 27). Nebyl zde zjištěn signifikantní rozdíl mezi genotypy. Mutantní rostliny *kup9* měly tendenci mít nižší suchou hmotnost prýtu oproti rostlinám divokého typu, rozdíl však nebyl signifikantní a činil 6% (graf č. 33). Nebyl zjištěn ani signifikantní rozdíl v suché hmotnosti kořenů oproti rostlinám divokého typu, rozdíl činil 3% (graf č. 34). Mutantní rostliny *kup9* neměly tendenci mít nižší suchou hmotnost kořenů oproti rostlinám divokého typu (graf č. 34). Za podmínek nízké ozáření nebylo pozorováno

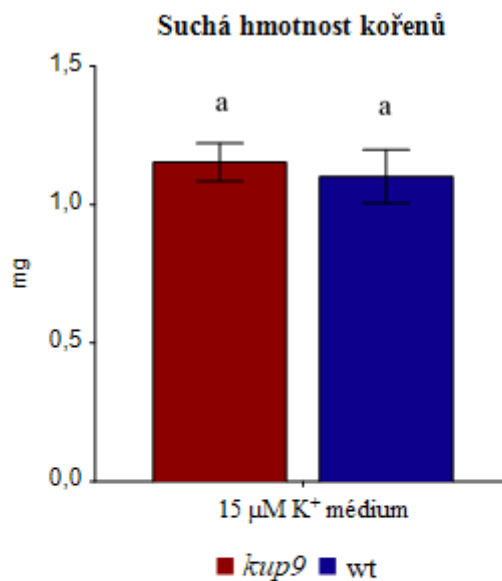
očekávané prohloubení růstového fenotypu *kup9* mutantů oproti kultivacím se standardní ozářeností (PAR=110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).



Obrázek č. 27: Experiment s reakcí mutantních rostlin *kup9* na nízkou ozářenost. Vlevo rostliny divokého typu (wt), vpravo mutantní rostliny *kup9* (mut). Varianta 15 μM K^+ médium. Ozářenost a fotoperioda = 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a 8 hod světlo, 16 hod tma prvních 14 dní kultivace + 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a 8 hod světlo, 16 hod tma následující 4 týdny. Měřítka - 1 cm.



Graf č. 33: Suchá hmotnost prýtu, průměr \pm SE, $n = 25$. Fotoperioda = 8 hod světlo, 16 hod tma. Ozáření = $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).

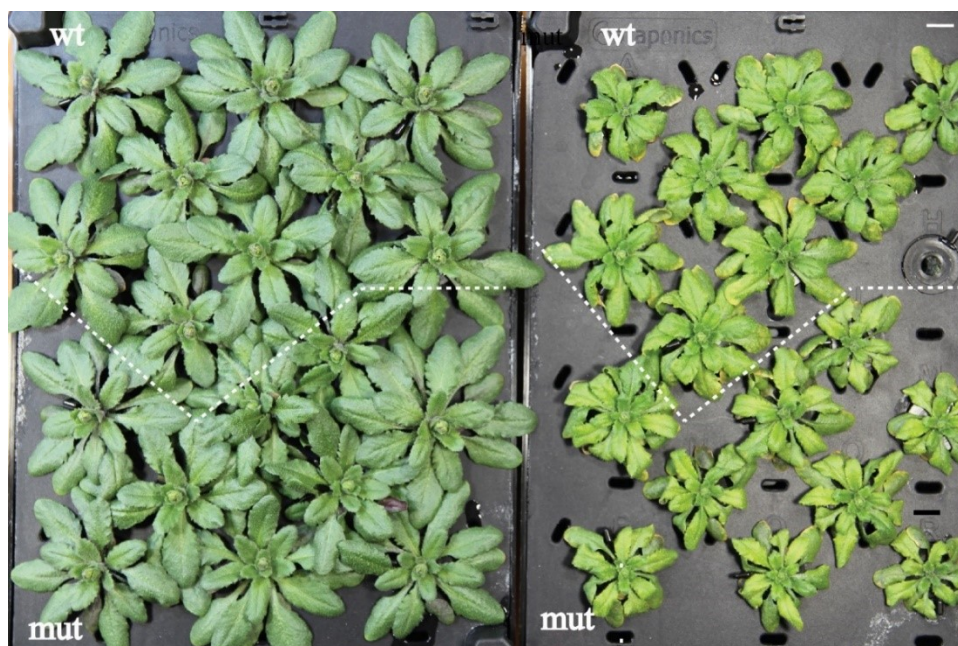


Graf č. 34: Suchá hmotnost kořenů, průměr \pm SE, $n = 25$. Fotoperioda = 8 hod světlo, 16 hod tma. Ozáření = $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rozdíly mezi genotypy $p > 0,05$ (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).

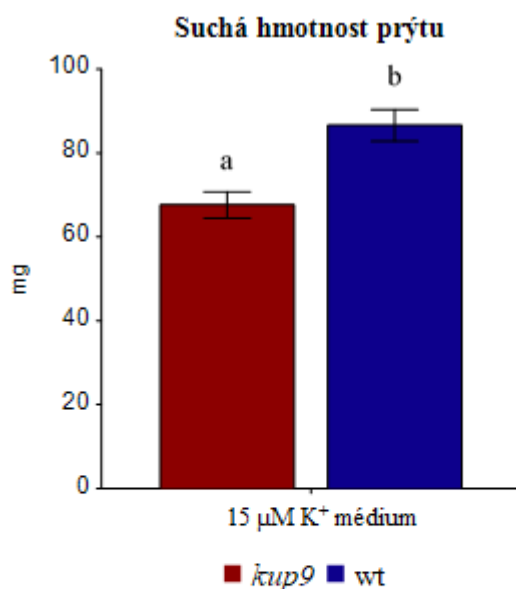
5. experiment

V tomto experimentu byly rostliny 3 týdny pěstovány na standardní ozáření (PAR=110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) v podmínkách krátkého dne a poté byly na 15 dní vystaveny fotoperiodě dlouhého dne a postupně se zvyšující ozáření (PAR=270-500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, viz 3.4.4 Hydroponická kultivace, 5. experiment).

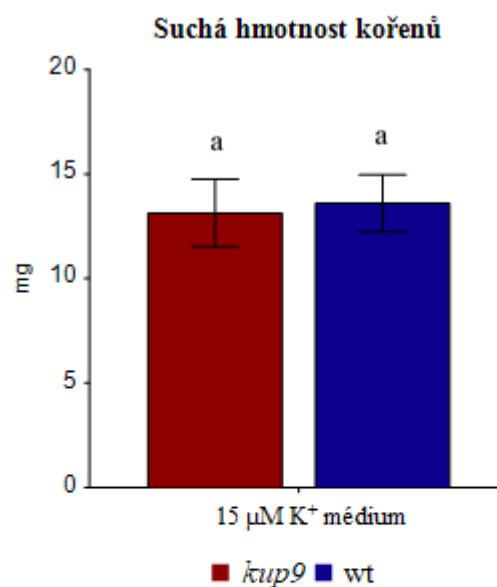
Mutantní rostliny *kup9* měly za těchto podmínek celkově zhoršený růst oproti rostlinám divokého typu. Mutantní rostliny *kup9* měly signifikantně menší suchou hmotnost prýtu oproti rostlinám divokého typu, rozdíl činil 12% (graf č. 35). Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi genotypy v suché hmotnosti kořenů, rozdíl činil 2% (graf č. 36). Mutantní rostliny *kup9* měly velmi mírnou tendenci mít menší suchou hmotnost kořenů oproti rostlinám divokého typu, rozdíl však nebyl signifikantní (graf č. 36). Za podmínek vysoké ozáření nebylo pozorováno očekávané prohloubení růstového fenotypu *kup9* mutantů oproti kontrolní kultivaci. Mutantní rostliny nevykazovaly výraznější žloutnutí listů po vystavení vysoké ozáření ve srovnání s rostlinami divokého typu (obrázek č. 28).



Obrázek č. 28: Experiment s reakcí mutantních rostlin *kup9* na vysokou ozáření. V horní polovině nádob jsou rostliny divokého typu (wt), ve spodní polovině nádob jsou mutantní rostliny *kup9* (mut). Levá nádoba – 4 mM K⁺ médium, pravá nádoba – 15 μM K⁺ médium. Fotoperioda – 16 hod světlo, 8 hod tma. Ozáření a fotoperioda = 110 μmol/m²/s a 8 hod světlo, 16 hod tma první 3 týdny kultivace + 270-500 μmol/m²/s a 16 hod světlo, 8 hod tma následujících 15 dní kultivace. Měřítko – 1 cm.



Graf č. 35: Suchá hmotnost prýtu, průměr ± SE, n = 15-20. Fotoperioda = 8 hod světlo, 16 hod tma. Ozáření 500 μmol/m²/s. Rozdíly mezi genotypy p < 0,05 (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).



Graf č. 36: Suchá hmotnost kořenů, průměr ± SE, n = 15-20. Fotoperioda = 8 hod světlo, 16 hod tma. Ozáření = 500 μmol/m²/s. Rozdíly mezi genotypy p > 0,05 (One Way ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison Test). Rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi genotypy (Bonferroni Multiple Comparison Test).

5 Diskuze

5.1 Růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin

Za účelem ověřit růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin byly vyselektovány mutantní rostliny linie *kup5-2* spolu s odpovídajícími rostlinami divokého typu. S těmito rostlinami jsem provedla kultivační experimenty pro zhodnocení růstu kořenového systému a produkce biomasy. Na 2. nezávislé linii mutantních rostlin jsem pozorovala obdobný růstový fenotyp jako na 1. linii. Na mutantních rostlinách linie *kup5-1* byl pozorován celkově delší kořenový systém a zvýšení produkce biomasy (Štočková, 2020). Experimenty s *kup5-2* ukázaly u těchto rostlin celkově delší kořenový systém a zvýšení produkce biomasy oproti rostlinám divokého typu. U *kup5-2* mutantních rostlin je zajímavý také jejich vyšší relativní obsah vody prýtu a kořenů oproti rostlinám divokého typu. Vzhledem k tomu, že *kup5-1* a *kup5-2* mutantní rostliny vykazují stejný růstový fenotyp, je velmi pravděpodobné, že je tento fenotyp spojen s transportérem KUP5, respektive s jeho nefunkčností v těchto mutantech. K potvrzení této souvislosti byla zároveň vytvořena transformovaná linie, kdy byl do mutantního pozadí *kup5-1* a *kup5-2* vložen konstrukt nesoucí kódující sekvenci genu *KUP5* spolu s nativním promotorem tohoto genu (konstrukt *pKUP5::KUP5:term*). Kvůli nedostatku času a problémům s kvantitativní PCR, která sloužila k přesnému určení míry exprese genu *KUP5* v jednotlivých selektovaných liniích transformovaných rostlin, bohužel není analýza růstového fenotypu těchto transformantů součástí této diplomové práce. Bude dokončena v navazujících experimentech.

Při nedostatku K^+ dochází u rostlin *A. thaliana* ke žloutnutí listů (Wang et al., 2013) a ke změnám v architektuře kořenového systému, kdy se snižuje počet a růst postranních kořenů prvního řádu a růst hlavního kořene (Hermans et al., 2006; Kellermeier et al., 2014; Šustr et al., 2019). Pro mutanty v některých transportérech rodiny KT/HAK/KUP je popsána výraznější reakce na snížení K^+ v prostředí oproti rostlinám divokého typu. Příkladem jsou mutantní rostliny *kup9*, u kterých se při nedostatku K^+ objevuje výrazná redukce kořenového systému (Šustr, 2015; Zhang et al., 2020). Na nedostatek K^+ jsou citlivé i mutantní rostliny *kup7*, u kterých dochází k celkové redukci růstu a výraznému žloutnutí listů (Han et al., 2016). Mutantní rostliny *hak5* také vykazují citlivost ke sníženému obsahu K^+ v prostředí (Gierth, 2005). Dle výsledků Mgr. Hany Štočkové (Štočková, 2020) a dle mých výsledků to vypadá, že mutanti *kup5-1* a *kup5-2* nereagují na snížení obsahu K^+

v médiu výrazněji než rostliny divokého typu. V mých experimentech bylo při nedostatku K^+ u mutantních rostlin a rostlin divokého typu pozorováno žloutnutí listů, snížení celkové délky kořenového systému včetně změny v jeho architektuře (zkrácení postranních kořenů) a snížení produkce biomasy. Mutantní rostliny *kup5-2* ale nereagovaly na snížení obsahu K^+ citlivěji oproti rostlinám divokého typu. Důvodem by mohla být krátká doba vystavení rostlin nízké dostupnosti K^+ (2 dny) při kultivaci rostlin pro analýzu růstu kořenového systému. Avšak v kultivaci pro zhodnocení produkce biomasy byly rostliny vystaveny nízké dostupnosti K^+ na delší dobu (12 dní), tudíž by se zde rozdíl mezi genotypy pravděpodobně stihl projevit. Ani v tomto případě však rozdíl mezi genotypy nebyl zjištěn.

5.1.1 Možný mechanismus způsobující růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin

Naše teorie ohledně možného mechanismu, který způsobuje větší vzrůst *kup5* mutantních rostlin, vycházela především z práce Osakabe et al., 2013, kde pracovali s mutanty v transportérech KUP2, KU6, KUP8 a GORK. Transportéry KUP2,6,8 patří do stejné rodiny KT/HAK/KUP transportérů jako KUP5, řadí se však do jiného klastru (Gupta et al., 2008; Nieves-Cordones et al., 2016). Draselný kanál GORK ze skupiny Shaker-like K^+ kanálů se nachází na membráně svěřacích buněk průduchů, kde se účastní výdeje K^+ z těchto buněk při uzavírání průduchů, a také se účastní výdeje K^+ z buněk kořene (Becker et al., 2003; Hosy et al., 2003). Dvojití mutanti *kup68* a trojití mutanti *kup268* a *kup68gork* měli vyšší produkci biomasy a celkově větší vzrůst oproti rostlinám divokého typu, podobně jako *kup5* mutanti. Autoři naměřili signifikantně větší velikost buněk listového mezofylu u těchto mutantů a navrhli teorii, že se transportéry KUP2,6,8 účastní výdeje K^+ z buněk, čímž regulují jejich turgor a následně i jejich objemový růst a velikost. V této práci však netestovali, zda transportéry KUP2,6,8 skutečně transportují K^+ z buněk ven. Detekovali však větší rychlost příjmu $^{86}Rb^+$ jako analogu K^+ v mutantech *kup268* a *kup68gork* (Osakabe et al., 2013). Usuzují proto, že větší velikost buněk trojitých mutantů *kup268* je dána větším hromaděním K^+ v buňkách, respektive méně efektivním výdejem K^+ z buněk, což vede k jejich výraznějšímu objemovému růstu. Podobnou hypotézu o funkci máme i pro transportér KUP5, který by se mohl účastnit transportu K^+ z buněk, čímž by negativně ovlivňoval jejich turgor a následně i jejich růst a velikost. Rostliny

s nefunkčním transportérem KUP5 by proto mohly mít větší buňky podobně jako mutanti *kup268*.

Pro bližší pochopení růstového fenotypu *kup5* mutantních rostlin bylo tedy provedeno měření velikosti buněk kořenů a hypokotylů. Kořenový systém a hypokotylly byly totiž u *kup5* mutantních rostlin delší oproti rostlinám divokého typu. Měření potvrdilo, že buňky primární kůry kořene a buňky hypokotylů jsou u *kup5* mutantů signifikantně větší oproti rostlinám divokého typu. Pravděpodobně v důsledku větší velikosti těchto buněk jsou *kup5* mutanti větší, mají celkově delší kořenový systém, vyšší produkci biomasy a vyšší relativní obsah vody. Velikost buněk listového mezofylu však z časových důvodů měřena nebyla. I přesto tyto výsledky z měření buněk podporují naši teorii o roli KUP5 v regulaci turgoru a objemovém růstu buněk. Zároveň tuto teorii podporují moje výsledky z pozorování rostlin nesousících konstrukt s reportérovým genem pro glukuronidázu (GUS) pod nativním promotorem genu *KUP5* (transkripční fúze, konstrukt *pKUP5:GUS*). V rámci kořenového systému byla aktivita GUS signalizující expresi genu *KUP5* detekována u mladých (4 – 7 dní) i starších (10 – 14 dní) rostlin v elongační zóně kořene, což by mohlo odpovídat funkci KUP5 v regulaci turgoru u právě probíhajícího objemového růstu buněk této zóny. Dále byla exprese genu *KUP5* zachycena u mladých rostlin (4 – 7 dní) v té oblasti hypokotylu, kde rovněž dochází k objemovému růstu buněk, v pokožce vyvíjejících se děložních a prvních pravých listů a v rostoucích řapících pravých listů. Exprese genu *KUP5* byla patrná také ve vyvíjejících se trichomech mladých rostlin (4 – 7 dní).

Otázkou ovšem zůstává, jak přesně by transportér KUP5 zajišťoval řízení turgoru a ovlivňoval objemový růst buněk. Schopnost KUP5 transportovat K^+ v rostlinách totiž stále není dokázána. Transport K^+ prostřednictvím KUP5 byl dokázán u jiných organismů, které byly defektní ve vlastním transportu K^+ , např. v *trk1-trk2* mutantních kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Al-Younis et al., 2018) nebo v mutantech *Escherichia coli* TK2420 (Ahn et al., 2004). V obou zmíněných publikacích se ale jednalo o obnovení vstupu K^+ do buněk kvasinek a bakterií prostřednictvím KUP5, což nepodporuje teorii o výdeji K^+ z buněk v rámci regulace turgoru. Pro transportér KUP7, který je v rámci rodiny KT/HAK/KUP řazen do stejného klastru jako KUP5 a je mu nejbližší příbuzný (Gupta et al., 2008; Nieves-Cordones et al., 2016), je dokázáno, že transportuje K^+ do buněk (Han et al., 2016). V rámci této diplomové práce jsem se ani já nevěnovala tomu, zda KUP5 transportuje K^+ , proto nemohu tuto teorii o roli KUP5 v regulaci turgoru prostřednictvím výdeje K^+ z buněk jednoznačně potvrdit ani vyvrátit. Pro analýzu obsahu K^+ v *kup5-1* mutantních rostlinách a rostlinách divokého typu jsem provedla hydroponickou kultivaci

s použitím 4 mM K⁺ média a 15 μM K⁺ média. Z časových důvodů však analýza obsahu K⁺ nebyla provedena a výsledky proto nejsou součástí této diplomové práce.

Existuje však ještě další teorie možného mechanismu fungování KUP5. Podle Al-Younis et al., 2018 zajišťuje KUP5 vstup K⁺ do buňky (dokázáno pouze na mutantech *E. coli* TK2420, viz výše), přičemž tato funkce je závislá na jeho adenylátcyklázové (AC) aktivitě. Prostřednictvím této aktivity by mohl fungovat jako regulátor ostatních K⁺ transportérů a kanálů, a tím i ovlivňoval turgor buněk (obrázek č. 5). Následně by v mutantních rostlinách *kup5* nedocházelo k regulaci toku K⁺, což by mohlo vést ke zvýšení turgoru a celkové větší velikosti buněk. U *kup5* mutantních rostlin použitých v této práci předpokládám, že byl inzercí vyřazen z funkce celý transportér včetně AC aktivity. Žádné podrobnější experimenty k dokázání toho, že AC aktivita opravdu nebyla funkční, jsem ale nedělala. Pro bližší objasnění fungování transportéru KUP5 v regulaci turgoru by bylo dobré použít mutantní rostliny, které mají defekt pouze v AC aktivitě KUP5 transportéru. Následně by se dal porovnat růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin použitých v této práci a mutantů v AC aktivitě KUP5 transportéru. Zároveň je potřeba dodělat experimenty, které objasní, jak se transportér KUP5 podílí na transportu K⁺ v rostlinách.

Dle mých výsledků mají *kup5* mutantní rostliny také delší meristematickou zónu kořene oproti rostlinám divokého typu. Delší kořenový systém *kup5* mutantních rostlin tedy pravděpodobně souvisí nejen s větší velikostí buněk kořene, ale i se zvýšenou aktivitou meristému. Pro udržení normální aktivity meristému je důležitý polární transport auxinu (Huang et al., 2019; Lee et al., 2013). Bylo také zjištěno, že v podmínkách nedostatku K⁺ dochází k narušení transportu auxinu v kořenech, čímž se může snižovat aktivita meristému (Li et al., 2017). Pokud by se KUP5 podílel na výdeji K⁺ z buněk, *kup5* mutantní rostliny by měly v buňkách více K⁺, což by se mohlo projevit vyšší aktivitou meristému. Dle článku Zhang et al., 2020 je pro udržení aktivity meristému důležitá homeostáze auxinu a K⁺ v buňkách, na které se podílí transportér KUP9. Transportér KUP9 v podmínkách nedostatku K⁺ transportuje auxin i K⁺ z ER do cytoplazmy, čímž se podílí na potřebné homeostázi (Zhang et al., 2020). Je tedy možné, že by se i transportér KUP5 mohl podílet na udržení homeostáze K⁺ nebo auxinu v buňkách kořene, čímž by ovlivňoval aktivitu meristému.

5.1.2 Lokalizace proteinu KUP5 v buňce

Pro další pochopení toho, jak přesně transportér KUP5 funguje, je potřeba znát jeho lokalizaci v buňce. Transportéry rodiny KT/HAK/KUP mají v rámci buňky různou lokalizaci, která je spojena s jejich funkcí. Transportér HAK5 je lokalizován na plazmatické membráně (Gierth, 2005; Qi et al., 2008), transportér KUP7 také na plazmatické membráně (Han et al., 2016), transportér KUP9 na endoplazmatickém retikulu (Zhang et al., 2020). Podle čipových dat (Cell eFP Browser) je lokalizace transportéru KUP5 predikována na plazmatické membráně (PM). V některých studiích byla pravděpodobná lokalizace KUP5 určena na tonoplastu vakuoly (Jaquinod et al., 2007). Umístění KUP5 na tonoplastu vakuoly nebo na plazmatické membráně by mohlo odpovídat roli KUP5 v regulaci turgoru buněk. Podle výsledků Mgr. Hany Štočkové je ale transportér KUP5 pravděpodobně lokalizován na endoplazmatickém retikulu (Štočková, 2020). Pro ověření této lokalizace a zároveň pro zjištění, zda se lokalizace nemění při nedostatku K^+ , bylo provedeno mikroskopické pozorování linie rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 se značeným proteinem KUP5 pomocí GFP. Z mých výsledků je patrná lokalizace proteinu KUP5-GFP v ER stejně jako v pozorování Mgr. Štočkové. Tato lokalizace se neměnila ani po vystavení rostlin nedostatku K^+ po dobu 1 nebo 2 dní. Tuto lokalizaci však nemůžeme považovat za definitivně prokázanou. Abychom mohli považovat lokalizaci KUP5 v buňce za správně určenou (respektive ověřit platnost jeho lokalizace v ER), bylo by potřeba vytvořit rostlinu *Arabidopsis* Col-0 se značeným proteinem KUP5 pomocí GFP a zároveň se značeným ER pomocí jiného fluorescenčního proteinu, např. RFP (red fluorescence protein), a dokázat kolokalizaci obou zmíněných signálů v jedné rostlině. V rámci experimentů Mgr. Hany Štočkové a mých experimentů byly protein KUP5 a ER značeny v jednotlivých rostlinách, ne společně (Štočková, 2020). Kolokalizace tedy není jednoznačně prokázána, je pouze předpokládána na základě podobnosti lokalizace obou signálů.

Důležitější je ale ověřit, zda fúzní protein KUP5-GFP správně funguje a pozorovaná lokalizace v ER odpovídá lokalizaci nativního proteinu KUP5. Při nefunkčnosti KUP5-GFP by pozorovaná lokalizace v ER nemusela být nativní lokalizací KUP5. Pro další ověření správnosti lokalizace KUP5 v ER byly vytvořeny linie *kup5* mutantních rostlin s vloženým konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP*. Z časových důvodů bohužel nebyl u těchto linií hodnocen růstový fenotyp a rostliny nebyly pozorovány pod mikroskopem. Selektované linie transformovaných rostlin jsou připraveny pro další experimenty. Zároveň

se aktuálně pracuje na přípravě konstruktů *pKUP5::KUP5-GFP* se značením GFP na N-konci proteinu.

Je tedy zřejmé, že moje výsledky ukazující absenci změny lokalizace KUP5 v buňce po vystavení rostlin podmínkám nízké dostupnosti K^+ také nejsou definitivní. Pokud by však byla lokalizace KUP5 v ER správná, mohl by se transportér KUP5 podílet na udržování homeostáze K^+ v buňce transportem K^+ mezi ER a cytoplazmou, podobně jako transportér KUP9 (Zhang et al., 2020), což nevylučuje možnou roli transportéru KUP5 v regulaci turgoru buněk. Zároveň by se KUP5 zřejmě nijak zásadně nepodílel na příjmu K^+ z prostředí. Aby mohl být transportér důležitý v příjmu minerální živiny z prostředí, měl by být lokalizován na plazmatické membráně nebo by mělo docházet k přesunu transportéru právě na plazmatickou membránu za podmínek nedostatku dané živiny. Toto bylo zjištěno např. pro transportér HAK5, který je pro příjem K^+ z prostředí s nízkým obsahem K^+ velmi důležitý (Gierth, 2005). Pomocí izolace různých membránových frakcí byla pozorována zvýšená přítomnost HAK5 na plazmatické membráně za podmínek nízké dostupnosti K^+ , naproti tomu v podmínkách dobré zásobenosti K^+ se více proteinu nacházelo ve frakci obsahující ER a tonoplast (Qi et al., 2008). Podobně transportér bóru, BOR1 (high boron requiring 1), je za podmínek nízké dostupnosti borátového iontu v prostředí exponován na plazmatickou membránu (Takano et al., 2010). Jak již bylo zmíněno výše, při mikroskopickém pozorování K^+ deficientních rostlin jsem nezaznamenala přesun transportéru KUP5 na plazmatickou membránu. V mých experimentech zároveň nebyly *kup5* mutantní rostliny citlivé k nedostatku K^+ , respektive byly stejně citlivé jako rostliny divokého typu. Naproti tomu u transportéru KUP7, pro který je dokázána lokalizace na plazmatické membráně a účast na příjmu K^+ z prostředí, je dokázána citlivost *kup7* mutantních rostlin k nedostatku K^+ (Han et al., 2016). Stejně tak *hak5* mutantní rostliny jsou velmi citlivé k nedostatku K^+ v prostředí (Gierth, 2005). Zdá se tedy pravděpodobnější, že by se transportér KUP5 mohl podílet na udržování homeostáze K^+ v buňce, nikoliv na jeho příjmu z prostředí v podmínkách deficeience.

Zde se nabízí srovnání s rostlinami mutantními v transportéru KUP9. Mutantní rostliny *kup9* mají za nedostatku K^+ také odlišný růstový fenotyp ve srovnání s rostlinami divokého typu, konkrétně mají celkově menší vzrůst a redukovaný kořenový systém (Zhang et al., 2020). Tento růstový fenotyp však nesouvisí s redukcí příjmu K^+ z prostředí, protože transportér KUP9 je lokalizován na ER a pravděpodobně se tedy příjmu K^+ z prostředí neúčastní. Tento transportér byl objeven na ER buněk kořene a specificky na ER buněk klidového centra apikálního meristému kořene (Zhang et al., 2020). Podle této práce

transportér KUP9 reaguje za podmínek nízké dostupnosti K^+ v prostředí tak, že transportuje K^+ a auxin z ER do cytoplazmy, čímž zajistí homeostázi těchto dvou komponent v buňkách, a apikální meristém kořene může zůstat funkční. Pokud transportér KUP9 nefunguje, tak je v buňkách nedostatek K^+ a auxinu, čímž apikální meristém kořene produkuje méně buněk a kořenový systém je redukován, jako je tomu u *kup9* mutantů (Zhang et al., 2020). Pokud by byla lokalizace KUP5 na ER správná, není vyloučeno, že by se i transportér KUP5 mohl podílet na toku K^+ či auxinu mezi ER a cytoplazmou. Schopnost transportovat auxin je popsána např. i pro transportér KUP4/TRH1 z rodiny KT/HAK/KUP (Daras et al., 2015; Rigas et al., 2013).

5.1.3 Lokalizace exprese genu *KUP5* v rostlině

K objasnění funkce transportéru KUP5 je důležité zjistit, ve kterých částech rostliny se exprimuje gen *KUP5*. Z výsledků pozorování rostlin nesousících konstrukt s reportérovým genem pro glukuronidázu (GUS) pod nativním promotorem genu *KUP5* (transkripční fúze, konstrukt *pKUP5:GUS*) vyplývá několik poznatků. Jak již bylo zmíněno, gen je exprimován v elongační zóně kořene, v rostoucím hypokotylu, v pokožce vyvíjejících se děložních a pravých listů a ve vyvíjejících se trichomech, což by mohlo souviset s funkcí KUP5 v regulaci turgoru buněk během jejich růstu či regulaci růstu buněk jiným mechanismem. Exprese genu *KUP5* byla zjištěna také ve svěracích buňkách průduchů (více viz 5.2 Reakce *kup5* mutantních rostlin na podmínky sucha). Kromě toho je však velmi silná exprese genu *KUP5* detekovatelná v kořenové čepičce. U některých silně se barvících rostlin to vypadalo, jako by se barvilo i klidové centrum kořenového meristému. Po bližším prozkoumání kořenové špičky a zaostření do různých rovin, především na povrch kořene a do střední roviny kořene, jsme došli k závěru, že přítomnost slabého signálu v oblasti meristému pochází ze silně se barvící kořenové čepičky a apikální meristém kořene se pravděpodobně nebarví (viz obrázek č. 22 B, C). Otázkou je, jakou roli by mohl mít transportér KUP5 v kořenové čepičce. V souvislosti s mými ostatními výsledky ohledně role KUP5 v regulaci turgoru je možné, že transportér KUP5 reguluje turgor a velikost buněk i u kořenové čepičky. Nabízí se však i jiná teorie. Některé vysokoafinitní transportéry jiných živin byly lokalizovány v kořenové čepičce, kde slouží jako senzory dané živiny v prostředí. Vysokoafinitní transportér NRT1;1 (nitrate transporter 1;1) je lokalizován v buňkách rhizodermis, kde slouží k příjmu NO_3^- z prostředí (Krouk et al., 2010; Liu et al., 1999). Zároveň je lokalizován v kořenové čepičce, kde slouží jako senzor

dostupnosti NO_3^- a exprese genu pro NRT1;1 je zde vyšší při zvýšené koncentraci NO_3^- v prostředí (Krouk et al., 2010). Podobně vysokoafinitní transportér pro příjem NH_4^+ , AMT1;3 (ammonium transporter 1;3), je lokalizován v rhizodermis a zároveň v kořenové čepičce, kde slouží jako senzor dostupnosti NH_4^+ (Lima et al., 2010). Oba tyto transportéry skrze snímání dostupnosti NO_3^- nebo NH_4^+ zprostředkovávají lokalizovanou odpověď kořenového systému, a to prodlužování postranních kořenů v případě NO_3^- a větvení postranních kořenů v případě NH_4^+ (Krouk et al., 2010; Lima et al., 2010). Není tedy vyloučeno, že by i transportér KUP5 fungoval v kořenové čepičce jako senzor dostupnosti K^+ . Bylo zjištěno, že draselný kanál AKT1 je pravděpodobně zapojen do snímání dostupnosti K^+ v prostředí. Mutantní rostliny *akt1* totiž nereagovaly na lokálně nízkou dostupnost K^+ v prostředí právě kvůli nefunkčnímu kanálu AKT1 (Li et al., 2017). Teorii o možné roli KUP5 jako senzoru K^+ však příliš nepodporuje skutečnost, že v mých experimentech reagovaly *kup5* mutantní rostliny na nedostatek K^+ v médiu většinou stejně jako rostliny divokého typu. V dalších experimentech by se mohly *kup5* mutantní rostliny vystavit i zvýšené koncentraci K^+ v médiu či by se zvýšené koncentraci K^+ mohla vystavit jen část kořenového systému a zhodnotila by se reakce mutantních rostlin a rostlin divokého typu, případně by se sledovala exprese genu *KUP5* za podmínek nízké a vysoké koncentrace K^+ v médiu. Není vyloučena ani možnost, že by se v určitých částech rostliny KUP5 účastnil transportu K^+ a regulace turgoru a zároveň by se v kořenové čepičce podílel na transportu auxinu či jiné látky. Jak jsem již zmínila, na transportu auxinu se z rodiny KT/HAK/KUP podílí i transportér KUP4/TRH1 a KUP9 , přičemž oba dva transportéry transportují i K^+ (Zhang et al., 2020; Daras et al., 2015; Rigas et al., 2013). Stejně tak zmíněný transportér NRT1;1 dokáže kromě NO_3^- transportovat auxin, čímž zprostředkovává prodlužování postranních kořenů (Krouk et al., 2010).

5.2 Reakce *kup5* mutantních rostlin na podmínky sucha

V *in vitro* kultivačních experimentech Mgr. Hany Štočkové byl v jednom ze dvou experimentů pozorován signifikantní rozdíl v relativním obsahu vody mezi *kup5* mutantními rostlinami a rostlinami divokého typu, konkrétně měly *kup5* mutantní rostliny vyšší relativní obsah vody (Štočková, 2020). Vzhledem k tomu, že byl tento rozdíl pozorován i v mých experimentech (grafy č. 7 a 8), jsme se rozhodli otestovat *kup5* mutantní rostliny v odolnosti vůči suchu v *ex vitro* podmínkách. Předpokládali jsme, že by

se transportér KUP5 mohl účastnit regulace toku K^+ ve svěracích buňkách průduchů a tím ovlivňoval hospodaření s vodou.

Podle mých výsledků to nevypadá, že by byly *kup5* mutantní rostliny výrazně citlivější k podmínkám sucha oproti rostlinám divokého typu, protože při zvoleném uspořádání vysychacího experimentu nejevily výraznější pokles obsahu vody v průběhu fáze akutního sucha. Na druhou stranu nelze jistou roli transportéru KUP5 v regulaci pohybu průduchů a hospodaření rostlin s vodou úplně vyloučit. Jedním z důvodů pro tento závěr jsou pozorované rozdíly v chování rostlin *in vitro* a *ex vitro*. V podmínkách *ex vitro* nebyly *kup5* mutantní rostliny větší a neměly vyšší relativní obsah vody oproti rostlinám divokého typu, jako tomu bylo v *in vitro* podmínkách. Je důležité si uvědomit, že *in vitro* podmínky představují pro rostlinu 100 % vlhkost a méně faktorů prostředí, které mohou růst rostlin ovlivnit. Proto je možné, že v *ex vitro* podmínkách nebyl tolik patrný rozdíl ve velikosti a obsahu vody mezi *kup5* mutanty a rostlinami divokého typu právě z důvodu mírně zhoršené regulace výdeje vody. Navíc je dle čipových dat predikována exprese genu *KUP5* mimojiné ve svěracích buňkách průduchů s předpokládaným nárůstem exprese tohoto genu po působení ABA (*Arabidopsis* eFP Browser - http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Tissue_Specific; Winter et al., 2007; Yang et al., 2008). Zároveň moje pozorování rostlin s transkripční fúzí *pKUP5:GUS* potvrdilo lokalizaci exprese genu *KUP5* ve svěracích buňkách průduchů (obrázek č. 24 B, D). Bylo by vhodné experimentálně zjistit, zda se exprese genu *KUP5* zvyšuje po působení ABA, jak je předpokládáno. Po působení ABA při nedostatku vody se zvyšuje exprese genu *KUP6*, přičemž bylo zjištěno, že transportér KUP6 se pravděpodobně podílí na transportu K^+ ze svěracích buněk při uzavírání průduchů (Maruyama et al., 2009; Osakabe et al., 2013). Proto by mohl i KUP5 hrát roli v transportu K^+ ve svěracích buňkách při pohybech průduchů, i když by měl ve srovnání s dalšími transportéry a kanály, které turgor svěracích buněk regulují (Cotelle and Leonhardt, 2016), pravděpodobně minoritní roli.

Skutečnost, že v *ex vitro* podmínkách nebyly pozorovány výrazné problémy s odolností rostlin vůči suchu, může souviset s použitím jednoduchého mutantu *kup5*. Osakabe et al., 2013 při použití jednoduchých mutantů *kup2*, *kup6* a *kup8* nebyli schopni zaznamenat odlišný růstový fenotyp oproti rostlinám divokého typu. Ten byl zaznamenán až u dvojitého mutantu *kup68* a trojitého mutantu *kup268*. V experimentech s působením ABA při nedostatku vody byly tedy použity mutantní rostliny *kup68*, *kup268* a *kup68gork*. Mutantní rostliny *kup268* už byly signifikantně citlivější k působení sucha oproti rostlinám divokého typu (Osakabe et al., 2013). V dalších experimentech s odolností vůči suchu by proto bylo

vhodné použít vícečetného mutanta, např. *kup57*. Transportér KUP7 je řazen s KUP5 do společného klastru (Gupta et al., 2008; Nieves-Cordones et al., 2016). Transportér KUP7 má stejně jako KUP5 funkční AC aktivitu (Al-Younis et al., 2015, 2018). Dle *Arabidopsis* eFP Browser je navíc gen *KUP7* také exprimován ve svěracích buňkách průduchů a jeho exprese se podobně jako u *KUP5* zvyšuje po působení ABA (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Tissue_Specific; Winter et al., 2007; Yang et al., 2008). Na druhou stranu, pro KUP7 je dokázáno, že se účastní příjmu a translokace K^+ xylémem, a *kup7* mutantní rostliny jsou citlivé k nedostatku K^+ ve srovnání s rostlinami divokého typu (Han et al., 2016). *Kup7* mutantní rostliny nejsou většího vzrůstu oproti rostlinám divokého typu jako je tomu u *kup5* mutantních rostlin (Han et al., 2016). I přesto by mohl být KUP7 vhodným kandidátem pro vytvoření vícečetného mutanta společně s KUP5 a tento mutant by mohl být testován v podmínkách nedostatku vody.

Transportér KUP5 by se však nemusel účastnit přímo regulace otevírání či zavírání průduchů, ale mohl by být důležitý v regulaci turgoru svěracích buněk při jejich růstu a vývoji. Tuto teorii by mohla podporovat skutečnost, že v mých experimentech byla aktivita GUS pod nativním promotorem *KUP5* detekována ve svěracích buňkách průduchů čtyřdenních až sedmidenních rostlin, ale nebyla detekována v desetidenních až čtrnáctidenních rostlinách.

5.3 Reakce *kup9* mutantních rostlin na podmínky prostředí

5.3.1 Reakce *kup9* mutantních rostlin na podmínky sucha

V kultivačních experimentech s *kup9* mutantními rostlinami byly už dříve zjištěny signifikantní rozdíly v relativním obsahu vody oproti rostlinám divokého typu (Šustr, 2015). Abychom zjistili, zda se transportér KUP9 podílí na hospodaření s vodou, otestovali jsme *kup9* mutantní rostliny a rostliny divokého typu v reakci na podmínky sucha v *ex vitro* podmínkách.

Podle mých výsledků se *kup9* mutantní rostliny nelišily v odolnosti vůči suchu či v hospodaření s vodou oproti rostlinám divokého typu. Mezi *kup9* mutantními rostlinami a rostlinami divokého typu byl patrný rozdíl ve velikosti, *kup9* mutantní rostliny byly celkově menší, ale rozdíl v relativním obsahu vody nebyl zaznamenán. Dle čipových dat je předpokládána exprese genu *KUP9* ve svěracích buňkách průduchů velmi nízká a pravděpodobně nedochází k navýšení exprese genu *KUP9* po působení ABA při nedostatku

vody (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Tissue_Specific; Winter et al., 2007; Yang et al., 2008). Ani Mgr. Marek Šustr, který vytvořil linii *Arabidopsis* Col-0 s konstruktem *pKUP9:GUS*, nezaznamenal aktivitu GUS ve svěracích buňkách průduchů (Šustr et al., 2018). Předpokládáme tedy, že se KUP9 nepodílí na hospodaření s vodou.

5.3.2 Reakce *kup9* mutantních rostlin na podmínky různé fotoperiody a ozáření

V kultivačních experimentech Mgr. Marka Šustra a v práci čínských vědců bylo zjištěno, že *kup9* mutantní rostliny jsou oproti rostlinám divokého typu za podmínek nízké dostupnosti K^+ celkově menšího vzrůstu a mají redukovaný kořenový systém (Zhang et al., 2020; Šustr, 2015). Tento fenotyp byl dán do souvislosti s rolí KUP9 v udržování aktivity apikálního meristému kořene prostřednictvím regulace homeostáze K^+ a auxinu v této oblasti (Zhang et al., 2020). Exprese genu *KUP9* byla však kromě kořenů pozorována také ve vodivých pletivech v celé rostlině (Šustr et al., 2018), je tedy možné, že má KUP9 i další funkce. Mohl by např. hrát roli v transportu K^+ floémem a ovlivňovat efektivitu floémového toku. Při stanovení této hypotézy jsme vycházeli z možné podobnosti s funkcí K^+ kanálu AKT2, který se účastní transportu K^+ ve floému a ovlivňuje efektivitu floémového toku (Deeken et al., 2002). Mutantní rostliny *akt2* byly menšího vzrůstu oproti rostlinám divokého typu a za podmínek fotoperiody krátkého dne, kdy se vytvořilo menší množství asimilátů než za podmínek dlouhého dne, se tento růstový fenotyp prohloubil (Gajdanowicz et al., 2011).

Pokud by byla teorie o roli KUP9 ve floému správná, podmínky různé ozáření by teoreticky měly růstový fenotyp *kup9* mutantních rostlin ovlivnit podobným způsobem jako u *akt2* mutantních rostlin. Nedostatek K^+ navíc vede k akumulaci sacharózy v listech a inhibici jejího exportu floémem (Cakmak, 2005), což by se opět mohlo silněji projevit u *kup9* mutantů. V podmínkách deficiencie K^+ , krátkého dne a standardní ozáření jsme proto očekávali mírné zhoršení růstového fenotypu *kup9* mutantních rostlin oproti stejným světelným podmínkám za dlouhého dne. Snížená efektivita floémového toku a menší množství asimilátů v listech by mělo zhoršit růst *kup9* mutantních rostlin. Dle mých výsledků byly *kup9* mutantní rostliny signifikantně menší oproti rostlinám divokého typu, rozdíl mezi genotypy byl nicméně stejný jako při kultivaci v podmínkách dlouhého dne.

Rostliny jsme proto vystavili podmínkám krátkého dne a nízké ozáření a testovali jsme, zda tato kombinace již dokáže vyvolat prohloubení růstového fenotypu *kup9* mutantních rostlin. Dle mých výsledků k tomu opět nedošlo, naopak, pozorovala jsem spíše zmírnění mutantního fenotypu, a *kup9* mutantní rostliny se za těchto podmínek nelišily v růstu oproti rostlinám divokého typu.

Rostliny rostoucí v podmínkách nedostatku K^+ jsou citlivé i na vysokou ozáření. Při vystavení rostlin podmínkám vysoké ozáření se objevuje chloróza a nekróza listů (Cakmak, 2005). I zde se předpokládá souvislost s exportem sacharózy z listů, která je v podmínkách K^+ deficience zhoršená, což vede k inhibici fotosyntézy, akumulaci ROS a oxidativnímu stresu (Cakmak, 2005). Testovali jsme proto chování *kup9* mutantních rostlin i v těchto podmínkách. Nižší efektivita floémového toku a hromadění asimilátů v listech by mohlo způsobit výraznější inhibici fotosyntézy, poškození fotosyntetického aparátu a zhoršení růstového fenotypu *kup9* mutantních rostlin. Dle mých výsledků k tomu však nedošlo. Mutantní rostliny měly stále zhoršený růst oproti rostlinám divokého typu, nelišily se však od *kup9* mutantních rostlin pěstovaných v podmínkách dlouhého dne a standardní ozáření. Z obrázku č. 28 je navíc patrné, že *kup9* mutantní rostliny nebyly na $15 \mu M K^+$ médiu (vpravo) citlivější k vysoké ozáření oproti rostlinám divokého typu, typické známky žloutnutí jsou viditelné ve stejné míře u obou genotypů.

Vzhledem k tomu, že za podmínek různé fotoperiody a ozáření nedošlo ke zhoršení růstu *kup9* mutantních rostlin, si tedy nejsme jisti, zda se transportér KUP9 nějak významně podílí na efektivitě floémového toku prostřednictvím transportu K^+ . Výsledky těchto kultivačních experimentů tomu spíše nenasvědčují. Probíhají nicméně i další experimenty, na kterých již pracuje Mgr. Marek Šustr. Jedná se o experimenty, ve kterých je zjišťován obsah sacharózy v listech, kořenech a ve floému. Tyto experimenty ukazují, že *kup9* mutantní rostliny obsahují více sacharózy v listech a méně v kořenech oproti rostlinám divokého typu. Roli KUP9 ve floémovém transportu proto zatím není možné jednoznačně vyloučit.

Je však také možné, že růstový fenotyp *kup9* mutantních rostlin souvisí s rolí KUP9 v udržování a regulaci auxinové homeostázy v buňkách prostřednictvím výdeje auxinu z ER nejen u buněk apikálního meristému kořene (Zhang et al., 2020), ale také v rámci vodivých pletiv celé rostliny či transportu auxinu rostlinou na dlouhou vzdálenost. Tuto možnost bude nutné dále testovat.

6 Závěr

V první části této diplomové práce jsem se věnovala bližší charakterizaci role transportéru KUP5 v rostlině. K tomuto účelu jsem použila dvě linie *kup5* mutantních rostlin nesoucích T-DNA inzerci v různých oblastech genu *KUP5*. U těchto rostlin jsem analyzovala růstový fenotyp. Dále jsem používala rostliny nesoucí konstrukt *pKUP5::KUP5-GFP* pro určení lokalizace proteinu KUP5 v buňce a rostliny nesoucí konstrukt *pKUP5::GUS* pro určení lokalizace exprese genu *KUP5* v rostlině. V rámci analýzy růstového fenotypu *kup5* mutantů se mi podařilo potvrdit, že *kup5-1* mutantní rostliny jsou celkově většího vzrůstu oproti rostlinám divokého typu. Tento růstový fenotyp se mi podařilo zjistit i u další nezávislé linie mutantních rostlin *kup5-2*. Dále jsem se zaměřila na detailní analýzu růstového fenotypu *kup5* mutantních rostlin - měření velikosti buněk primární kůry kořene a pokožky hypokotylu a měření délky meristematické zóny kořene. Podařilo se mi zjistit, že *kup5* mutantní rostliny mají větší buňky primární kůry kořene, pokožky hypokotylu i delší meristematickou zónu kořene oproti rostlinám divokého typu.

Zjistila jsem, že ani jedna linie *kup5* mutantních rostlin nevykazovala zvýšenou citlivost k nedostatku K^+ v kultivačním médiu. Zdá se proto nepravděpodobné, že by se KUP5 významnějším způsobem podílel na příjmu K^+ z prostředí v podmínkách jeho deficience. Dále se mi pomocí konstruktů *pKUP5::KUP5-GFP* podařilo ověřit lokalizaci proteinu KUP5 v ER za podmínek standardního obsahu K^+ v médiu (4 mM K^+) i za podmínek nízkého obsahu K^+ v médiu (15 μ M K^+). Tato lokalizace však bude potřebovat další ověření. Pomocí konstruktů *pKUP5::GUS* se mi podařilo určit expresi genu *KUP5* převážně v rostoucích částech rostliny (elongační zóna kořene, rostoucí hypokotyl, pokožka děložních a prvních pravých listů, rostoucí řapíky prvních pravých listů, vyvíjející se trichomy), ale také v kořenové čepičce, v pokožce i primární kůře kořenů nebo ve svěracích buňkách průduchů.

Odlišný růstový fenotyp *kup5* mutantních rostlin pravděpodobně souvisí s funkcí transportéru KUP5 v rostlině, neboť byl pozorován na dvou nezávislých T-DNA inzerčních liniích. Vzhledem k celkově většímu vzrůstu, větší velikosti buněk *kup5* mutantních rostlin a pozorované expresi genu *KUP5* v rostoucích částech rostliny je velmi pravděpodobné, že je transportér KUP5 zapojen do regulace růstu buněk, pravděpodobně prostřednictvím regulace turgoru. Mechanismus fungování transportéru KUP5 v regulaci turgoru však stále není jasný. Pro jeho objasnění je potřeba provést další experimenty, např. ověřit, zda je

KUP5 schopný transportu K^+ v rostlině, nebo přesně určit lokalizaci proteinu KUP5 v buňce. Lokalizace proteinu KUP5 v ER bude potřebovat další ověření. Je nezbytné zjistit, zda protein KUP5-GFP kolokalizuje se značeným ER v jedné rostlině. Dále je potřeba ověřit funkčnost proteinu KUP5-GFP, a to např. pozorováním transformovaných linií *kup5* mutantních rostlin s konstruktem *pKUP5::KUP5-GFP*, které byly vytvořeny v rámci této diplomové práce. To umožní zjistit, zda je KUP5-GFP schopen komplementovat mutantní fenotyp. Co se týče exprese genu *KUP5* v rostlině, další experimenty by měly být zaměřeny i na objasnění funkce KUP5 v kořenové čepičce nebo ve svěracích buňkách průduchů.

Ve druhé části této diplomové práce jsem se věnovala možné roli transportéru KUP5 v regulaci výdeje vody a transportéru KUP9 v regulaci výdeje vody a v translokaci K^+ floémem v odpovědi na podmínky různé fotoperiody a různé ozáření. K těmto účelům jsem použila T-DNA inzerční *kup5-1* a *kup9* mutantní rostliny. Nevypadá to, že by transportér KUP5 hrál zásadní roli v regulaci výdeje vody, jeho role bude pravděpodobně minoritní. Mohl by být však důležitý při vývoji a růstu svěracích buněk průduchu. Transportér KUP9 pravděpodobně nehraje žádnou roli v regulaci výdeje vody. Co se týče možné role KUP9 v translokaci K^+ floémem a efektivitě floémového toku, tato teorie se v rámci provedených experimentů nejeví jako pravděpodobná. V podmínkách různé fotoperiody a různé ozáření nedošlo u *kup9* mutantních rostlin k očekávanému prohloubení růstového fenotypu. Je tedy možné, že se transportér KUP9 v rámci rostliny neúčastní distribuce K^+ , ale plní jiné funkce.

7 Seznam použitých zdrojů

- Adams, E., Miyazaki, T., and Shin, R. (2019). Contribution of KUPs to potassium and cesium accumulation appears complementary in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 14, 1554468.
- Ahn, S.J., Shin, R., and Schachtman, D.P. (2004). Expression of KT/KUP Genes in *Arabidopsis* and the Role of Root Hairs in K⁺ Uptake. *Plant Physiol.* 134, 1135–1145.
- Aleman, F., Nieves-Cordones, M., Martinez, V., and Rubio, F. (2011). Root K⁺ Acquisition in Plants: The *Arabidopsis thaliana* Model. *Plant and Cell Physiology* 52, 1603–1612.
- Al-Younis, I., Wong, A., and Gehring, C. (2015). The *Arabidopsis thaliana* K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre. *FEBS Letters* 589, 3848–3852.
- Al-Younis, I., Wong, A., Lemtiri-Chlieh, F., Schmöckel, S., Tester, M., Gehring, C., and Donaldson, L. (2018). The *Arabidopsis thaliana* K⁺-Uptake Permease 5 (AtKUP5) Contains a Functional Cytosolic Adenylate Cyclase Essential for K⁺ Transport. *Front. Plant Sci.* 9, 1645.
- An, R., Chen, Q.-J., Chai, M.-F., Lu, P.-L., Su, Z., Qin, Z.-X., Chen, J., and Wang, X.-C. (2007). AtNHX8, a member of the monovalent cation:proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li⁺/H⁺ antiporter: AtNHX8 encodes an Li⁺/H⁺ antiporter. *The Plant Journal* 49, 718–728.
- Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., and Gaber, R.F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 3736–3740.
- Andres, Z., Perez-Hormaeche, J., Leidi, E.O., Schlucking, K., Steinhorst, L., McLachlan, D.H., Schumacher, K., Hetherington, A.M., Kudla, J., Cubero, B., et al. (2014). Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E1806–E1814.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., and Blumwald, E. (1999). Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256–1258.
- Aranda Sicilia, M.N., Sánchez Romero, M.E., Rodríguez Rosales, M.P., and Venema, K. (2020). Plastidial transporters KEA1 and KEA2 at the inner envelope membrane adjust stromal pH in the dark. *New Phytol* 17042.
- Araya, T., Noguchi, K., and Terashima, I. (2006). Effects of Carbohydrate Accumulation on Photosynthesis Differ between Sink and Source Leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Cell Physiology* 47, 644–652.

- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R.G., Meyerhoff, O., Hartung, W., and Hedrich, R. (2003). Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Letters* 554, 119–126.
- Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Voelker, C., et al. (2004). AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 15621–15626.
- Berthomieu, P. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal* 22, 2004–2014.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M., van den Dries, N., and Maurel, C. (2005). Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiol.* 139, 790–805.
- Brady, N.C., and Weil, R.R. (1996). The nature and properties of soils. (Prentice-Hall Inc.).
- Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 521–530.
- Cakmak, I., Hengeler, C., and Marschner, H. (1994). Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1251–1257.
- Cao, Y., Jin, X., Huang, H., Derebe, M.G., Levin, E.J., Kabaleeswaran, V., Pan, Y., Punta, M., Love, J., Weng, J., et al. (2011). Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature* 471, 336–340.
- Chen, Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., et al. (2007). Root Plasma Membrane Transporters Controlling K⁺/Na⁺ Homeostasis in Salt-Stressed Barley. *Plant Physiol.* 145, 1714–1725.
- Cheng, X., Liu, X., Mao, W., Zhang, X., Chen, S., Zhan, K., Bi, H., and Xu, H. (2018). Genome-Wide Identification and Analysis of HAK/KUP/KT Potassium Transporters Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *IJMS* 19, 3969.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnourne, M., Zimmermann, S., Véry, A.-A., Fizames, C., and Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2511–2532.
- Cotelle, V., and Leonhardt, N. (2016). 14-3-3 Proteins in Guard Cell Signaling. *Front. Plant Sci.* 6.
- Czempinski, K. (1997). New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *The EMBO Journal* 16, 2565–2575.

- Daloso, D.M., Anjos, L., and Fernie, A.R. (2016). Roles of sucrose in guard cell regulation. *New Phytol* 211, 809–818.
- Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Iacovides, T.A., and Hatzopoulos, P. (2015). Potassium transporter TRH1 subunits assemble regulating root-hair elongation autonomously from the cell fate determination pathway. *Plant Science* 231, 131–137.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., and Tester, M. (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 30, 497–507.
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S., and Hedrich, R. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta* 216, 334–344.
- Dietrich, D. (2018). Hydrotropism: how roots search for water. *Journal of Experimental Botany* 69, 2759–2771.
- Dijkwel, P.P., Kock, P.A., Bezemer, R., Weisbeek, P.J., and Smeekens, S.C. (1996). Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of the plastocyanin gene in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Physiology* 110, 455–463.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res* 19, 1349–1349.
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., and Reed, J.W. (2002). A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *Plant Cell* 14, 119–131.
- Epstein, E., Rains, D.W., and Elzam, O.E. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 49, 684.
- Fu, H.-H., and Luan, S. (1998). AtKUP1: A Dual-Affinity K⁺ Transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell* 10, 63–73.
- Fukaki, H., and Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* 69, 437–449.
- Gajdanowicz, P., Michard, E., Sandmann, M., Rocha, M., Correa, L.G.G., Ramirez-Aguilar, S.J., Gomez-Porras, J.L., Gonzalez, W., Thibaud, J.-B., van Dongen, J.T., et al. (2011). Potassium (K⁺) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 864–869.
- Garciadeblás, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A., and Rodríguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal* 34, 788–801.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., and Fink, G.R. (1999). The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 1480–1485.

Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.-B., and Sentenac, H. (1998). Identification and Disruption of a Plant Shaker-like Outward Channel Involved in K⁺ Release into the Xylem Sap. *Cell* 94, 647–655.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., et al. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *PNAS* 106, 21425–21430.

Geiger, D., Maierhofer, T., AL-Rasheid, K.A., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., and Grill, E. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci. Signal.* 4.

Genies, L., Martin, L., Kanno, S., Chiarenza, S., Carasco, L., Camilleri, V., Vavasseur, A., Henner, P., and Leonhardt, N. (2020). Disruption of AtHAK/KT/KUP9 enhances plant cesium accumulation under low potassium supply (*Plant Biology*).

Gierth, M. (2005). The Potassium Transporter AtHAK5 Functions in K⁺ Deprivation-Induced High-Affinity K⁺ Uptake and AKT1 K⁺ Channel Contribution to K⁺ Uptake Kinetics in Arabidopsis Roots. *PLANT PHYSIOLOGY* 137, 1105–1114.

Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., and Maathuis, F.J.M. (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 10726–10731.

Grabov, A. (2007). Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporters: Single Family - Multiple Functions. *Annals of Botany* 99, 1035–1041.

Gupta, M., Qiu, X., Wang, L., Xie, W., Zhang, C., Xiong, L., Lian, X., and Zhang, Q. (2008). KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*). *Mol Genet Genomics* 280, 437.

Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J.I., and Uozumi, N. (2015). HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 113–120.

Han, M., Wu, W., Wu, W.-H., and Wang, Y. (2016). Potassium Transporter KUP7 Is Involved in K⁺ Acquisition and Translocation in Arabidopsis Root under K⁺-Limited Conditions. *Molecular Plant* 9, 437–446.

Hauser, F., and Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell & Environment* 33, 552–565.

Hermans, C., Hammond, J.P., White, P.J., and Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* 11, 610–617.

Hirsch, R.E. (1998). A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. *Science* 280, 918–921.

Hoopen, F. t., Cuin, T.A., Pedas, P., Hegelund, J.N., Shabala, S., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2010). Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and Arabidopsis roots: molecular mechanisms and physiological consequences. *Journal of Experimental Botany* 61, 2303–2315.

Horie, T., Horie, R., Chan, W.-Y., Leung, H.-Y., and Schroeder, J.I. (2006). Calcium Regulation of Sodium Hypersensitivities of *sos3* and *athkt1* Mutants. *Plant and Cell Physiology* 47, 622–633.

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.-A., et al. (2003). The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 5549–5554.

Huang, L., Yu, L.-J., Zhang, X., Fan, B., Wang, F.-Z., Dai, Y.-S., Qi, H., Zhou, Y., Xie, L.-J., and Xiao, S. (2019). Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in *Arabidopsis*. *Autophagy* 15, 407–422.

Isner, J.C., Begum, A., Nuehse, T., Hetherington, A.M., and Maathuis, F.J.M. (2018). KIN7 Kinase Regulates the Vacuolar TPK1 K⁺ Channel during Stomatal Closure. *Current Biology* 28, 466–472.e4.

Iwata, S., Miyazawa, Y., Fujii, N., and Takahashi, H. (2013). MIZ1-regulated hydrotropism functions in the growth and survival of *Arabidopsis thaliana* under natural conditions. *Annals of Botany* 112, 103–114.

Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J., and Bourguignon, J. (2007). A Proteomics Dissection of *Arabidopsis thaliana* Vacuoles Isolated from Cell Culture. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 394–412.

Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T.J., Danku, J., Salt, D.E., and Amtmann, A. (2014). Analysis of the Root System Architecture of *Arabidopsis* Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals. *The Plant Cell* 26, 1480–1496.

Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., and Schroeder, J.I. (1998). AtKUP1: An Arabidopsis Gene Encoding High-Affinity Potassium Transport Activity. *The Plant Cell* 51–62.

Kobayashi, D., Uozumi, N., Hisamatsu, S., and Yamagami, M. (2010). AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ Transporter from *Arabidopsis thaliana*, Mediates Cs⁺ Uptake in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 203–205.

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. (2010). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* 18, 927–937.

Kunz, H.-H., Gierth, M., Herdean, A., Satoh-Cruz, M., Kramer, D.M., Spetea, C., and Schroeder, J.I. (2014). Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 7480–7485.

- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., and Thibaud, J.-B. (2000). A Shaker-like K⁺ Channel with Weak Rectification Is Expressed in Both Source and Sink Phloem Tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell* 12, 837–851.
- Lebaudy, A., Véry, A.-A., and Sentenac, H. (2007). K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* 581, 2357–2366.
- Lee, Y., Lee, W.S., and Kim, S.-H. (2013). Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. *Journal of Experimental Botany* 64, 1153–1165.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., and Hedrich, R. (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 4203–4208.
- Li, J., Wu, W.-H., and Wang, Y. (2017). Potassium channel AKT1 is involved in the auxin-mediated root growth inhibition in Arabidopsis response to low K⁺ stress: AKT1 regulates primary root growth under low K⁺ stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 59, 895–909.
- Li, W., Xu, G., Alli, A., and Yu, L. (2018). Plant HAK/KUP/KT K⁺ transporters: Function and regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 74, 133–141.
- Lima, J.E., Kojima, S., Takahashi, H., and von Wiren, N. (2010). Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-Dependent Manner. *The Plant Cell Online* 22, 3621–3633.
- Liu, K.-H., Huang, C.-Y., and Tsay, Y.-F. (1999). CHL1 Is a Dual-Affinity Nitrate Transporter of Arabidopsis Involved in Multiple Phases of Nitrate Uptake. *The Plant Cell* 11, 865–874.
- Luan, S., Lan, W., and Chul Lee, S. (2009). Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL–CIPK network. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 339–346.
- Maathuis a Amtmann (1999). K⁺Nutrition and Na⁺Toxicity: The Basis of Cellular K⁺/Na⁺Ratios. *Annals of Botany* 84, 123–133.
- Marschner, H. (2011). *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants* (Academic Press).
- Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., et al. (2009). Metabolic Pathways Involved in Cold Acclimation Identified by Integrated Analysis of Metabolites and Transcripts Regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* 150, 1972–1980.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., et al. (2001). Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126, 1646–1667.
- Miller, E.M., and Nickoloff, J.A. (1995). *Escherichia coli* electrotransformation. In *Electroporation Protocols for Microorganisms*, (Springer), pp. 105–113.

- Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321–4326.
- Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R.M., Martinez, V., Gaillard, I., and Rubio, F. (2016). Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. *Front. Plant Sci.* 7.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *The Plant Cell* 3, 677–684.
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U., Abo, M., et al. (2013). Osmotic Stress Responses and Plant Growth Controlled by Potassium Transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 609–624.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P. (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol* 202, 35–49.
- Ou, W., Mao, X., Huang, C., Tie, W., Yan, Y., Ding, Z., Wu, C., Xia, Z., Wang, W., and Zhou, S. (2018). Genome-wide identification and expression analysis of the KUP family under abiotic stress in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Frontiers in Physiology* 9, 17.
- Pavlová, L. (2005). *Fyziologie rostlin* (Praha: Karolinum).
- Peel, A.J., and Rogers, S. (1982). Stimulation of sugar loading into sieve elements of willow by potassium and sodium salts. *Planta* 154, 94–96.
- Pego, J.V., Kortstee, A.J., Huijser, C., and Smeekeens, S.C.M. (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 51, 407–416.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B., and Sentenac, H. (2001). Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity in Arabidopsis Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2. *J. Biol. Chem.* 276, 3215–3221.
- Pritchard, J. (1994). The control of cell expansion in roots. *New Phytol* 127, 3–26.
- Pyo, Y.J., Gierth, M., Schroeder, J.I., and Cho, M.H. (2010). High-Affinity K⁺ Transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions. *PLANT PHYSIOLOGY* 153, 863–875.
- Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J., and Schachtman, D.P. (2008). The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 59, 595–607.
- Quintero, F.J., and Blatt, M.R. (1997). A new family of K⁺ transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. *FEBS Letters* 415, 206–211.

Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K.A., Grabov, A., Dolan, L., and Hatzopoulos, P. (2001). TRH1 Encodes a Potassium Transporter Required for Tip Growth in Arabidopsis Root Hairs. *The Plant Cell* 14.

Rigas, S., Ditengou, F.A., Ljung, K., Daras, G., Tietz, O., Palme, K., and Hatzopoulos, P. (2013). Root gravitropism and root hair development constitute coupled developmental responses regulated by auxin homeostasis in the Arabidopsis root apex. *New Phytol* 197, 1130–1141.

Rubio, F., Santa-Maria, G.E., and Rodriguez-Navarro, A. (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol Plant* 109, 34–43.

Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., and Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* 134, 598–608.

Rubio, F., Fon, M., Ródenas, R., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Rivero, R.M., and Martínez, V. (2014). A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum* 152, 558–570.

Santa-Maria, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., and Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell* 9, 2281–2289.

Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., et al. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochemical Journal* 424, 439–448.

Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., and Gaber, R.F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* 258, 1654–1658.

Schleyer, M., and Bakker, E.P. (1993). Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K(+) uptake protein kup from Escherichia coli is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *Journal of Bacteriology* 175, 6925–6931.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., and Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6896–6901.

Smethurst, C.F., Rix, K., Garnett, T., Auricht, G., Bayart, A., Lane, P., Wilson, S.J., and Shabala, S. (2008). Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne: revealing the underlying cellular mechanisms. *Functional Plant Biology* 35, 640–650.

Soukup, A., and Tylová, E. (2014). Essential methods of plant sample preparation for light microscopy. *Plant Cell Morphogenesis*.

Štočková, H. (2020). Funkce transportéru AtKUP5 v Arabidopsis thaliana.

Su, H., Golldack, D., Zhao, C., and Bohnert, H.J. (2002). The Expression of HAK-Type K⁺ Transporters Is Regulated in Response to Salinity Stress in Common Ice Plant. *Plant Physiol.* 129, 1482–1493.

Šustr, M. (2015). Zapojení přenašečů AtKT/HAK/KUP do příjmu K⁺ a Cs⁺ rostlinami.

Šustr, M., Pokorný, J., Ježková, T., Soukup, A. and Tylová, E. Involvement of AtKT/HAK/KUP high-affinity transporters in plant K⁺ and Cs⁺ uptake. *Proceedings of the DSEBR Conference*; 2015.

Šustr, M., Doksanska, T., Soukup, A. and Tylová, E. Involvement of Potassium Transporter KUP9 in Potassium Distribution in Arabidopsis. *Proceedings of the Exposing the Hidden Half, 10th ISRR Symposium* 2018.

Šustr, M., Soukup, A., and Tylova, E. (2019). Potassium in Root Growth and Development. *Plants* 8, 435.

Šustr, M., Doksanská, T., Doležalová, B., Soukup, A., and Tylová, E. (2020). ¹³⁴Cs Uptake and Growth at Various Cs⁺ and K⁺ Levels in Arabidopsis AtKUP7 Mutants. *Plants* 9, 1525.

Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., and Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress: ROS and redox signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* 35, 259–270.

Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.-H., Bock, K.W., Conéjéro, G., Li, X., Twell, D., Ward, J.M., et al. (2004). Expression Patterns of a Novel AtCHX Gene Family Highlight Potential Roles in Osmotic Adjustment and K⁺ Homeostasis in Pollen Development. *Plant Physiol.* 136, 2532–2547.

Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., et al. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 2917–2921.

Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., and Fujiwara, T. (2010). Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 5220–5225.

Talbott, L.D., and Zeiger, E. (1996). Central Roles for Potassium and Sucrose in Guard-Cell Osmoregulation. *Plant Physiol.* 111, 1051–1057.

Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., and Schroeder, J.I. (2000). The Arabidopsis HKT1 Gene Homolog Mediates Inward Na⁺ Currents in *Xenopus laevis* Oocytes and Na⁺ Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 122, 1249–1260.

Véry, A.-A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., and Sentenac, H. (2014). Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *Journal of Plant Physiology* 171, 748–769.

Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P., and Grabov, A. (2004). Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots: TRH1 and auxin transport. *The Plant Journal* 40, 523–535.

Vieira-Pires, R.S., Szollosi, A., and Morais-Cabral, J.H. (2013). The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* 496, 323–328.

Vieten, A., Vanneste, S., Wiśniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., and Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132, 4521–4531.

Wang, Y., and Wu, W.-H. (2013). Potassium Transport and Signaling in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 451–476.

Wang, C., Yamamoto, H., Narumiya, F., Munekage, Y.N., Finazzi, G., Szabo, I., and Shikanai, T. (2017). Fine-tuned regulation of the K⁺/H⁺ antiporter KEA3 is required to optimize photosynthesis during induction. *Plant J* 89, 540–553.

Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S. (2013). The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *IJMS* 14, 7370–7390.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2, e718.

Wu, H., Shabala, L., Shabala, S., and Giraldo, J.P. (2018). Hydroxyl radical scavenging by cerium oxide nanoparticles improves *Arabidopsis* salinity tolerance by enhancing leaf mesophyll potassium retention. *Environ. Sci.: Nano* 5, 1567–1583.

Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N. *et al.* (2008). Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4, 6.

Ye, C.-Y., Yang, X., Xia, X., and Yin, W. (2013). Comparative analysis of cation/proton antiporter superfamily in plants. *Gene* 521, 245–251.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2006). The Regulatory Domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 Interacts with ABI1 and Integrates Abscissic Acid (ABA) and Osmotic Stress Signals Controlling Stomatal Closure in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5310–5318.

Zhang, M., Huang, P., Ji, Y., Wang, S., Wang, S., Li, Z., Guo, Y., Ding, Z., Wu, W., and Wang, Y. (2020). KUP9 maintains root meristem activity by regulating K⁺ and auxin homeostasis in response to low K. *EMBO Rep* 21.

Zhao, D., Oosterhuis, D.M., and Bednarz, C.W. (2001). Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* 39, 103–109.

Zhao, J., Cheng, N.-H., Motes, C.M., Blancaflor, E.B., Moore, M., Gonzales, N., Padmanaban, S., Sze, H., Ward, J.M., and Hirschi, K.D. (2008). AtCHX13 Is a Plasma Membrane K⁺ Transporter. *Plant Physiol.* 148, 796–807.

- Zhu, J.-K. (2000). Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using Arabidopsis. *124*, 8.
- Zörb, C., Senbayram, M., and Peiter, E. (2014). Potassium in agriculture – Status and perspectives. *Journal of Plant Physiology* *171*, 656–669.